

Exhibit 1

204508-

## Structure of the antithrombin-binding site in heparin

(anticoagulant activity/nonsulfated iduronic acid/nitrous acid deamination/periodate oxidation/disaccharide units in heparin)

ULF LINDAHL\*, GUDRUN BÄCKSTRÖM\*, MAGNUS HÖÖK\*, LENNART THUNBERG\*, LARS-ÅKE FRANSSON†, AND ALFRED LINKER‡

\*Department of Medical and Physiological Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, The Biomedical Center, S-751 23 Uppsala, Sweden;

†Department of Physiological Chemistry 2, University of Lund, S-220 07 Lund, Sweden; and ‡Veterans Administration Hospital, Salt Lake City, Utah 84143

Communicated by Albert Dorfman, April 16, 1979

**ABSTRACT** Heparin preparations from pig intestinal mucosa and from bovine lung were separated by chromatography on antithrombin-Sepharose into a high-affinity fraction (with high anticoagulant activity) and a low-affinity fraction (with low anticoagulant activity). Antithrombin-binding heparin fragments (12–16 monosaccharide units) were prepared, either by digesting a high-affinity heparin-antithrombin complex with bacterial heparinase or by partial deaminative cleavage of the unfractionated polysaccharide with nitrous acid followed by affinity chromatography on immobilized antithrombin. Compositional analysis based on separation and identification of deamination products reduced with sodium borohydride showed that nonsulfated L-iduronic acid occurred in larger amount in high-affinity heparin than in low-affinity heparin; furthermore, this component was concentrated in the antithrombin-binding regions of the high-affinity heparin molecules, amounting to approximately one residue per binding site. It is suggested that nonsulfated L-iduronic acid is essential for the anticoagulant activity of heparin. The location of the nonsulfated uronic acid in the antithrombin-binding site was determined by periodate oxidation of antithrombin-binding fragments containing a terminal 2,5-anhydro-D-[1-<sup>3</sup>H]mannitol unit. Tentative structures for antithrombin-binding sequences in heparin are proposed, including some structural variants believed to be compatible with, but not required for, activity.

Heparin interferes the coagulation of blood by accelerating the rate at which antithrombin, a plasma protein, inactivates the proteases of the so-called coagulation cascade (1). Binding of heparin to antithrombin appears to be an essential part of the mechanism (1, 2). The structural basis for such binding is unclear. Only about one-third of the molecules in heparin preparations bind with high affinity to antithrombin and this fraction (in the following denoted "high-affinity heparin") accounts for most of the anticoagulant activity of the unfractionated material (3–5). Characterization of fragments obtained on digesting a heparin-antithrombin complex with bacterial heparinase indicated that the antithrombin-binding site in heparin molecules involves a sequence of about 12–16 monosaccharide units (6). Recently, Rosenberg *et al.* (7) claimed that a tetrasaccharide sequence with a N-sulfated glucosamine residue at its reducing end, a N-acetylated internal glucosamine unit, and one residue each of D-glucuronic and L-iduronic acid would represent a critical structural element required for anticoagulant activity.

The present study involves the structural characterization of antithrombin-binding regions from two different types of heparin, isolated from pig intestinal mucosa and from bovine lung, respectively.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U. S. C. §1734 solely to indicate this fact.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** Heparin (stage 14) from pig intestinal mucosa was obtained from Inolex Pharmaceutical Division (Park Forest South, IL). Heparin from bovine lung was kindly donated by the Upjohn Company (Kalamazoo, MI). Both preparations were purified by repeated precipitation with cetylpyridinium chloride from 1.2 M NaCl (8). Samples (50 mg) were fractionated by affinity chromatography on a 75-ml column of antithrombin covalently linked to Sepharose (9). A typical separation of mucosal heparin is illustrated in Fig. 1; lung heparin gives a similar picture. Some analytical data for the isolated materials are shown in Table 1. Gel chromatography on Sephadex G-100 of the mucosal and lung heparin fractions having high affinity for antithrombin gave peak partition coefficients,  $K_{av}$ , values of 0.19 and 0.23, respectively, corresponding to molecular weights of about 15,000–20,000 (9).

Antithrombin-binding heparin fragments were isolated after digesting high-affinity heparin fractions with bacterial heparinase in the presence of antithrombin, essentially as described (3). Heparin (about 5 mg) bound to 5 ml of antithrombin-Sepharose (5–7 mg of protein per ml) was exhaustively digested with 1 mg of enzyme. The isolated (6) enzyme-resistant fragments showed narrow, single peaks on Sephadex G-100 chromatography, with a  $K_{av}$  value of 0.62 (same for mucosal and lung heparin fragments). This value indicates a molecular weight in the order of 3500–5000, corresponding to six to eight disaccharide units (see ref. 6).

Alternatively, antithrombin-binding fragments were isolated by affinity chromatography after random partial depolymerization of heparin with nitrous acid. The procedure involved treatment of unfractionated pig mucosal heparin with nitrous acid as described by Cifonelli and King (10), except that the reaction was carried out at +10°C and was interrupted after 2 min. The products precipitable with 10 vol of ethanol were fractionated by affinity chromatography on antithrombin-Sepharose (9). Most of the material consisted of oligosaccharides that were not retained by antithrombin-Sepharose. However, a significant fraction was absorbed to the gel; on gradient elution a peak of uronic acid-containing components, corresponding to 2–3% of the starting material, appeared in the elution position of high-affinity heparin. A portion of the material eluting at  $\geq 1$  M NaCl was reduced with sodium borohydride (11), yielding a product (specific activity,  $1.0 \times 10^5$  cpm per  $\mu$ g of uronic acid) with terminal 2,5-anhydro-[1-<sup>3</sup>H]mannitol units. The labeled fragments retained a high affinity for antithrombin (Fig. 1). Gel chromatography showed

<sup>1</sup> In view of the presumably random nature of the deaminative depolymerization process this yield, recorded in two separate preparations, is unexpectedly high. No obvious explanation can be given at present.

Analytical data for heparin

Preparation	Uronic acid,* %	Hexosamine,* %	disaccharide*	Anticoagulant activity, <sup>†</sup> units/mg
Pig mucosal heparin				
High-affinity fraction <sup>‡</sup>	33.7	21.5	1.94	259
Subfraction I	—	—	—	307
Subfraction II	—	—	—	401
Subfraction III	—	—	—	431
Low-affinity fraction	36.4	24.4	1.74	29
Bovine lung heparin				
High-affinity fraction	28.7	21.5	2.13	237
Low-affinity fraction	28.2	22.4	2.20	32

\* Percent of sample weight, not corrected for moisture. The hexosamine values are not corrected for losses during hydrolysis.

<sup>†</sup> Molar ratios with uronic acid as 1.00.

<sup>‡</sup> Determined by the *British Pharmacopoeia* whole-blood assay (left column), or by the colorimetric antithrombin-activation assay (right column).

<sup>§</sup> The terms "high-affinity" and "low-affinity" refer to the interaction of heparin with antithrombin. The separation of the two types of heparin by affinity chromatography on immobilized antithrombin is shown in Fig. 1. The subfractions of high-affinity heparin were obtained by combining effluent fractions eluting at NaCl concentrations between 0.4 and 0.9 M (subfraction I), 0.9 and 1.2 M (subfraction II), and 1.2 and 1.7 M (subfraction III), respectively.

a monodisperse component (see Fig. 4); the  $K_{av}$  on Sephadex G-100 was 0.65, in reasonable agreement with the value (0.62) recorded for antithrombin-binding fragments obtained by the enzymatic procedure.

Glucuronosyl-2,5-anhydro-[1-<sup>3</sup>H]mannitol disaccharides with O-sulfate groups in various positions were obtained as described (11).

Purified  $\alpha$ -L-iduronidase [specific activity about 120 units (12) per mg of protein] from human kidney was kindly given to us by Leonard H. Rome (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The enzyme degraded iduronosyl-2,5-anhydro-[1-<sup>3</sup>H]mannitol 6-sulfate to a labeled product that migrated like anhydromannitol 6-sulfate on paper electrophoresis (11) but had no detectable effect on either glucuronosyl-2-anhydro-[1-<sup>3</sup>H]mannitol 6-sulfate or iduronosyl 2-sulfate-2-anhydro-D-[1-<sup>3</sup>H]mannitol 6-sulfate.

**Analytical Methods.** Methods for the determination of uronic acid, hexosamine, sulfate, and radioactivity have been described (13). Gel chromatography of poly- or oligosaccharides was carried out as described in refs. 6 and 14.

Anticoagulant activities were determined by the *British Pharmacopoeia* whole-blood assay (15). Alternatively, the antithrombin-activating potency was determined as described by Laurent et al. (9) and related to that of a heparin preparation (3rd International Standard) of known activity.

The disaccharide composition of heparin preparation was determined as described in ref. 11 and outlined in the legend to Table 2.

**Periodate Oxidation.** Periodate oxidation followed by alkali treatment and reduction was carried out as described (16).

## RESULTS AND DISCUSSION

In a previous study from this laboratory the presumed antithrombin-binding site of heparin was isolated after digestion of heparin-antithrombin complexes with bacterial heparinase (6). In the present investigation antithrombin-binding fragments were also prepared by a different method, involving partial, random depolymerization of heparin with nitrous acid followed by affinity chromatography on antithrombin-Sepharose. The size of the smallest antithrombin-binding fragment, obtained by this method was similar to that of the fragments obtained by the enzymatic procedure, corresponding to six to eight disaccharide units. These results thus confirm our previous conclusions regarding the size of the antithrombin-binding site in heparin (6, 9).

Evidence presented below indicates that the antithrombin-binding site in heparin does not consist of a single, unique oligosaccharide sequence but has a variable structure. However, certain regions within this sequence appear to be nonvariable and should therefore be of critical importance to the interaction between heparin and antithrombin. One of these nonvariable components has been identified as non-sulfated L-iduronic acid, tentatively allocated to position 3 of the binding sequence, position 1 being the nonreducing terminal unit. This is illustrated in Fig. 2, which depicts the antithrombin-binding site as a tetradecasaccharide sequence (see the legend to the figure). The evidence for the proposed structure is based on two types of experiments. First, analysis of di- and tetrasaccharides formed on deamination with nitrous acid showed a prepon-

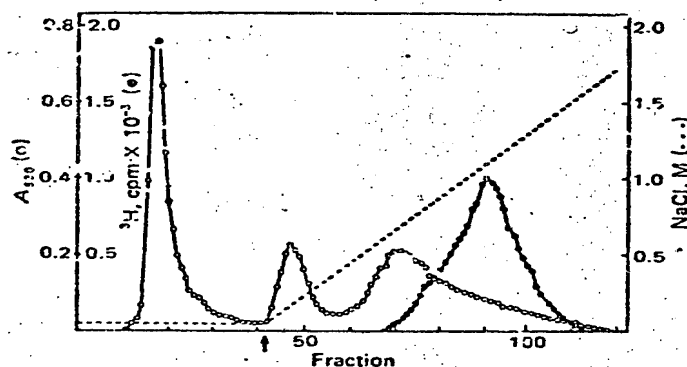


FIG. 1. Affinity chromatography on antithrombin-Sepharose (9) of 50 mg of pig mucosal heparin (○) mixed with 3  $\mu$ g of <sup>3</sup>H-labeled antithrombin-binding fragment (●), obtained by partial random depolymerization of the same heparin with nitrous acid (see the text). Effluent fractions were analyzed for uronic acid (○) or for radioactivity (●). The salt gradient (starting at arrow) used for elution is indicated by the broken line. In preparative experiments the first two peaks of uronic acid-containing material (one of nonadsorbed material and one eluting at less than 0.4 M NaCl), representing heparin species essentially devoid of anticoagulant activity (9), were combined into one low-affinity fraction, whereas material eluting at greater than 0.4 M NaCl was considered to be of high-affinity type.

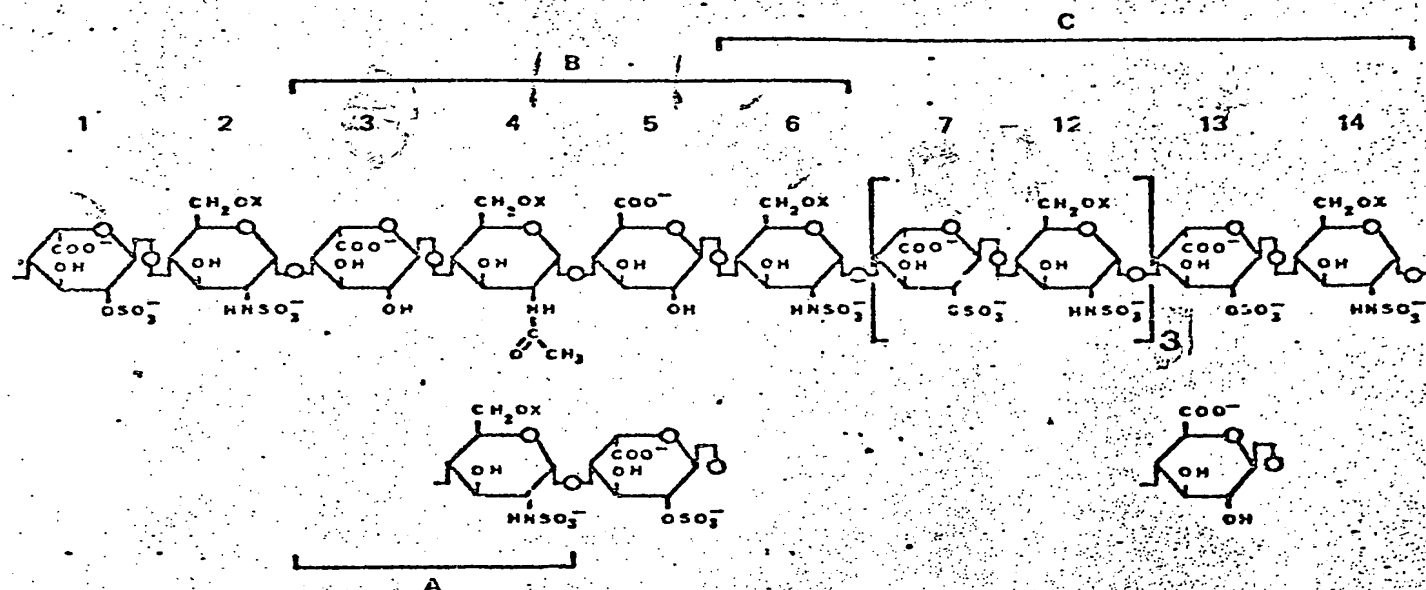


FIG. 2. Tentative structure for the antithrombin-binding site of pig mucosal heparin. X = H or SO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The continuous sequence represents the majority of the binding sites, whereas the isolated sugar units below (at positions 4, 5, and 13) represent structural variants compatible with (but not required for) anticoagulant activity. The variant unit in position 13 has been indicated as D-glucuronic acid, although it has been identified only as a nonsulfated uronic acid residue (see the legend to Fig. 4). The total number of disaccharide units per antithrombin-binding site has been set at seven, on the basis of gel chromatography data (see Fig. 4 and the text), but may instead be six or eight; such deviations from the structure shown should presumably affect only the portion of the sequence to the right of position 7. The labeled antithrombin-binding fragments obtained after partial deaminative cleavage of heparin contain 2,5-anhydro-[1-<sup>3</sup>H]mannitol in position 14. For additional details, including explanation of the segments A, B, and C, see the text.

derance of nonsulfated L-iduronic acid in the antithrombin-binding site, as compared to other regions of the heparin molecules. Second, the position of nonsulfated uronic acid residues was determined by periodate oxidation of antithrombin-binding fragments having <sup>3</sup>H-labeled 2,5-anhydromannitol end groups (in position 14).

#### Composition of Antithrombin-Binding Fragments

Preparations of heparin or of antithrombin-binding fragments were subjected to compositional analysis as outlined in the legend to Table 2. The deamination products obtained were largely glycuronosyl→2,5-anhydro[<sup>3</sup>H]mannitol disaccharides with the di-O-sulfated species, iduronosyl 2-sulfate→anhydromannitol 6-sulfate predominating (Table 2). In addition, three different monosulfated disaccharides occurred in the deamination products of all samples. One of these disaccharides, iduronosyl→anhydromannitol 6-sulfate, was consistently obtained in larger amounts from high-affinity heparins than from low-affinity heparins. Furthermore, the antithrombin-binding fragments gave higher yields of this particular disaccharide than did the corresponding high-affinity heparins. These results suggest that the L-iduronosyl→N-sulfo-D-glucosaminyl 6-sulfate disaccharide unit is concentrated in the antithrombin-binding regions of heparin molecules.

In addition to disaccharides, the deamination products, especially those derived from mucosal heparin, contained appreciable amounts of tetrasaccharide (Table 2). These tetrasaccharides should have the general structure glycuronosyl→N-acetylglucosaminyl→glycuronosyl→anhydro[<sup>3</sup>H]mannitol (ref. 10; however, see footnote<sup>2</sup> in Table 2). On incubation with purified α-L-iduronidase such tetrasaccharides, isolated from mucosal high-affinity heparin, were converted to labeled trisaccharides (Fig. 3B) to a larger extent than were the corresponding tetrasaccharides derived from low-affinity heparin (Fig. 3C). The α-L-iduronidase-susceptible tetrasac-

charide, like the iduronosyl→anhydromannitol 6-sulfate disaccharide, was obtained in higher yield (about 70% of the total tetrasaccharide) from the antithrombin-binding fragment (Fig. 3A) than from the parent high-affinity heparin. Because the enzyme preparation contained neither β-glucuronidase nor iduronate 2-sulfatase activity, such tetrasaccharides must have nonsulfated iduronic acid residue in the nonreducing terminal position. The total nonsulfated iduronic acid, as represented by the sum of the iduronosyl→anhydromannitol 6-sulfate disaccharide and the α-L-iduronidase-susceptible tetrasaccharide (see Table 2), equaled or exceeded one residue per antithrombin-binding site in mucosal heparin.<sup>2</sup> This applied probably also to lung heparin, judging from the amounts of iduronosyl→anhydromannitol 6-sulfate and tetrasaccharide, respectively, formed on deamination of isolated antithrombin-binding fragment (Table 2); however, the effect of α-L-iduronidase on the tetrasaccharide could not be properly evaluated, due to poor separation of the labeled digestion products.

The presence of a nonsulfated L-iduronic acid residue, presumably in each antithrombin-binding site, and the relative lack of such residues in heparin molecules having low affinity for antithrombin (see Table 2 and Fig. 3) strongly suggest that nonsulfated L-iduronic acid is essential to the anticoagulant activity of heparin. Exhaustive digestion of antithrombin-binding fragment with α-L-iduronidase did not significantly affect its affinity for antithrombin, as shown by subsequent affinity chromatography (as in Fig. 1), suggesting an internal rather than terminal location for the essential nonsulfated iduronic acid. For reasons discussed below this residue will be

<sup>2</sup> Total amount of disaccharide containing nonsulfated L-iduronic acid =  $[4.3 + (2.7 \cdot 34/29)]/100 = 16\%$  of total disaccharide units. One such disaccharide unit per tetrasaccharide-binding site would correspond to 14% of the total disaccharide units.

Table 2. Products formed on deamination of heparin fractions

Preparation	% of disaccharide units recovered as**				
	Tetra-saccharide†	Iduronosyl 2-sulfate→ anhydromannitol 6-sulfate	Glucuronosyl→ anhydromannitol 6-sulfate	Iduronosyl→ anhydromannitol 6-sulfate	Iduronosyl 2-sulfate→ anhydromannitol
Mucosal heparin					
Antithrombin-binding fragment <sup>‡</sup> (nitrous acid)	35 (1.2)	48 (3.4)	5.9 (0.4)	4.9 (0.3)	6.2 (0.4)
Antithrombin-binding fragment <sup>‡</sup> (heparinase)	34 (1.2)	49 (3.5)	6.9 (0.5)	4.3 (0.3)	5.3 (0.4)
High-affinity fraction	27	56	7.9	2.8	6.1
Low-affinity fraction	27	50	11.0	1.8	10.0
Lung heparin					
Antithrombin-binding fragment <sup>‡</sup> (heparinase)	17 (0.6)	65 (4.5)	5.9 (0.4)	7.2 (0.5)	5.0 (0.4)
High-affinity fraction	17	68	5.1	4.6	6.3
Low-affinity fraction	15	72	4.8	1.9	6.2

\* The method used to determine the disaccharide composition of heparin preparations is described in detail elsewhere (11). Briefly, polysaccharide (10–50 µg of uronic acid) is treated with nitrous acid, under conditions resulting in conversion of N-sulfated glucosamine residues to 2,5-anhydromannose units, with cleavage of the glucosaminidic linkages. The samples are reduced with sodium borohydride and the labeled di- and oligosaccharides are fractionated by a combination of gel chromatography, high-voltage paper electrophoresis, and paper chromatography. In the present experiments no significant amounts of oligosaccharides larger than tetrasaccharides were observed. Nonsulfated disaccharide invariably amounted to less than 1% of the total disaccharides.

† Values within parentheses indicate moles per mole of antithrombin-binding fragment, assuming seven disaccharide units per molecule.

‡ Deaminative cleavage of heparin-like polysaccharides yields tetrasaccharides where isolated N-acetylated disaccharide units occur surrounded by N-sulfated units (10). However, tetrasaccharides may also be formed by an anomalous (deaminative ring contraction) reaction in which N-sulfated glucosamine residues are converted into 2-aldehyde-D-pentofuranoside units without cleavage of the glycosidic bond (17, 18). The tetrasaccharide contents given should therefore represent maximal values.

\* The antithrombin-binding fragments analyzed were isolated after partial depolymerization of heparin with nitrous acid or with bacterial heparinase, as indicated. For further experimental details, see the text.

allocated to position 3 in the sequence shown in Fig. 2. The adjacent glucosamine residue (position 4) can apparently be either N-sulfated or N-acetylated; after deamination–reduction the N-sulfated residues were recovered (as anhydromannitol) in iduronosyl→anhydromannitol 6-sulfate disaccharides (corresponding to segment A in Fig. 2), whereas the analogous N-acetylated units were included in tetrasaccharides (segment B in Fig. 2). When the glucosamine residue at position 4 is N-acetylated the following sugar unit (no. 5 in Fig. 2) will be predominantly or exclusively D-glucuronic acid (19), because a glucuronic acid residue bound to C-1 of a N-acetylated (rather than N-sulfated) glucosamine unit is a poor substrate (or not a substrate) for the epimerase that catalyzes the formation of iduronic acid units during biosynthesis of heparin (unpublished data). When the glucosamine residue in position 4 is N-sulfated the following uronic acid unit (position 5) may probably be either glucuronic or iduronic acid.

#### Periodate oxidation of antithrombin-binding fragments

Taken together, the results presented above indicated that the majority of antithrombin-binding sites in the mucosal heparin contained the iduronosyl→N-acetylglucosaminyl→glucuronosyl→N-sulfoglucosaminyl sequence recovered as a tetrasaccharide after deamination with nitrous acid. The location of the glucuronosyl moiety, and hence of the entire tetrasaccharide sequence (segment B in Fig. 2) in the antithrombin-binding site was determined by periodate oxidation. Antithrombin-binding fragment, isolated after partial deaminative cleavage of mucosal heparin and <sup>3</sup>H-labeled at the reducing end, was subjected to periodate oxidation at pH 7, 37°C, for 3 hr, followed by scission in alkali. This treatment should result in cleavage of any nonsulfated uronic acid residues present (16). Analysis of the products by gel chromatography (Fig. 4) showed that the material had been degraded and appeared as essentially

two major peaks of radioactivity. The less retarded fraction consisted of a distinct, sharp peak at the elution position of a nona- or undecasaccharide, along with a smaller amount of somewhat larger components. The corresponding antithrombin-binding fragments must thus have included a terminal sequence of four (as assumed in Fig. 2) or five consecutive disaccharide units containing 2-sulfated (periodate-resistant) iduronic acid residues, followed by a disaccharide unit containing a nonsulfated (periodate-susceptible) uronic acid residue. The periodate-resistant region would correspond to segment C in Fig. 2. In order to comply with the periodate cleavage pattern the glucuronosyl moiety of the tetrasaccharide structure referred to above would have to be allocated to position 5. The iduronosyl moiety would then be in position 3, leaving positions 1 and 2 to be occupied by a terminal N-sulfated disaccharide unit.

The additional products of periodate oxidation, besides the major component at 103 ml effluent volume (Fig. 4), presumably reflect variations in the structure of the antithrombin-binding site. The shoulder around 90 ml may thus represent antithrombin-binding fragments cleaved at position 3 only, due to the presence of a sulfated iduronic acid residue at position 5. Analysis of the retarded peak (at 140 ml) is described in the legend to Fig. 4.

#### Concluding remarks

At least seven different disaccharide units are present in heparin (11). Due to the specificities of the enzymes involved in the biosynthesis of heparin (20) these units are linked to each other in a fashion that is only partly random; certain combinations are favored whereas others are precluded. However, even with these inherent restrictions the number of tetradecasaccharide sequences likely to occur in heparin molecules must be exceedingly large. The number of such sequences capable of binding to antithrombin is obviously smaller (9) but may still

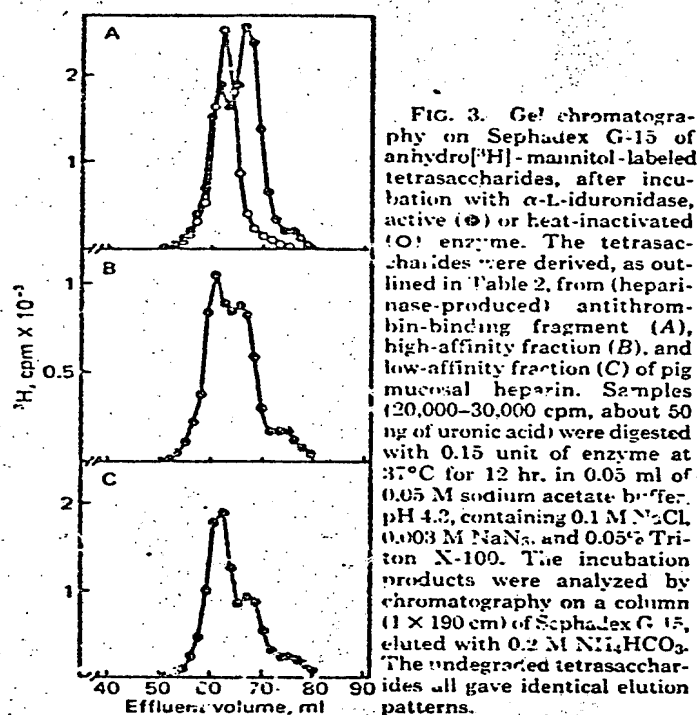


FIG. 3. Gel chromatography on Sephadex G-15 of anhydro[ $^3\text{H}$ ]-mannitol-labeled tetrasaccharides, after incubation with  $\alpha$ -L-iduronidase, active ( $\bullet$ ) or heat-inactivated ( $\circ$ ) enzyme. The tetrasaccharides were derived, as outlined in Table 2, from (heparinase-produced) antithrombin-binding fragment (A), high-affinity fraction (B), and low-affinity fraction (C) of pig mucosal heparin. Samples (20,000–30,000 cpm, about 50 ng of uronic acid) were digested with 0.15 unit of enzyme at  $37^\circ\text{C}$  for 12 hr. in 0.05 ml of 0.05 M sodium acetate buffer, pH 4.2, containing 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.003 M  $\text{NaN}_3$ , and 0.05% Triton X-100. The incubation products were analyzed by chromatography on a column (1  $\times$  190 cm) of Sephadex G-15, eluted with 0.2 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . The undegraded tetrasaccharides all gave identical elution patterns.

be considerable, as suggested by the present structural analysis of antithrombin-binding heparin fragments. The structural variability is probably the reason for the extended elution pattern of high-affinity heparin (as defined in Fig. 1) on affinity chromatography. It is not possible at present to fully define the variable (in addition to positions 4, 5, and 13) and nonvariable (in addition to position 3) regions in the antithrombin-binding site. Obviously, the nonsulfated iduronic acid in position 3 cannot represent the only structural feature that is essential for the high-affinity binding of heparin to antithrombin, because such residues occur also in the low-affinity fraction (Table 2). Additional nonvariable regions must therefore occur elsewhere in the sequence.

Our conclusions regarding the structural requirements for anticoagulant activity differ from those of Rosenberg *et al.* (7). The tetrasaccharide sequence (see introduction) implicated in their study appears to be essential only to the extent that it contributes a nonsulfated iduronic acid residue: the N-acetylglucosaminyl-glucuronosyl component would rather represent one of the structural variants (at positions 4 and 5 in Fig. 2) compatible with, but not required for, activity. The preferential association of nonsulfated iduronic acid with this disaccharide sequence can be rationalized in terms of the biosynthetic mechanisms (see above and ref. 20). Although the data available do not exclude that the glucuronic acid component may also be required for anticoagulant activity, there is at present no reason to postulate such a requirement.

The authors are grateful to Dr. L. H. Rome for providing the  $\alpha$ -L-iduronidase, to Mr. B. Ajaxon, AB Vitrum (Stockholm), for carrying out the British Pharmacopoeia assays for anticoagulant activity, and to Drs. T. C. Laurent and L. Rodén for valuable suggestions. This work was supported by grants from the Swedish Medical Research Council (139,2309,5197); the U.S. Public Health Service (AM-13412); the Veterans Administration (Project No. 5268-02); the Faculty of Veterinary Medicine (Swedish University of Agricultural Sciences); AB Kabi, Stockholm; and the Greta och Johan Kocks Stiftelse.

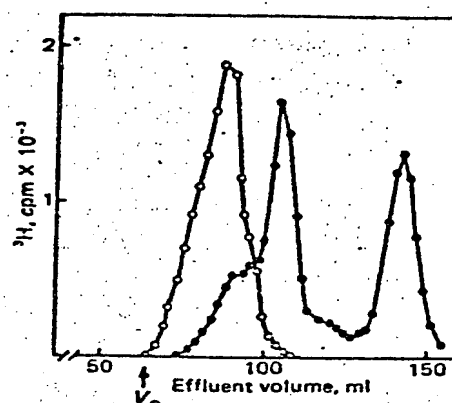


FIG. 4. Gel chromatography on Sephadex G-50 (14) of antithrombin-binding fragment from mucosal heparin before ( $\circ$ ) and after ( $\bullet$ ) periodate/alkali treatment.  $V_0$ , void volume. The fragment had been obtained by limited depolymerization of mucosal heparin with nitrous acid and contained a  $^3\text{H}$ -labeled, terminal anhydro-mannitol residue (see the text). Comparison with reference oligosaccharides derived from heparin-like polysaccharides (unpublished data) indicated that the undegraded material is a tetradecasaccharide and the major degradation product (peak elution volume, 103 ml), a nona- or undecasaccharide. Prolonging the reaction time with periodate to 16 hr did not affect the elution pattern. Analysis of the retarded peak (at 140 ml) by paper electrophoresis and paper chromatography (11) indicated 30% anhydromannitol 6-sulfate and about 20% anhydromannitol, in addition to unidentified components. Apparently some of the antithrombin-binding sites must have contained a nonsulfated uronic acid residue in position 13 (see Fig. 2).

- Rosenberg, R. D. (1977) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 36, 10–12.
- Nordenman, B., Danielsson, Å. & Björk, I. (1974) *Eur. J. Biochem.* 50, 1–6.
- Lam, L. H., Silbert, J. E. & Rosenberg, R. D. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 570–577.
- Höök, M., Björk, I., Hopwood, J. & Lindahl, U. (1976) *FEBS Lett.* 66, 90–93.
- Andersson, L.-O., Barrowcliffe, T. W., Holmer, E., Johnson, Z. A. & Sims, C. E. (1976) *Thromb. Res.* 9, 575–583.
- Hopwood, J., Höök, M., Linker, A. & Lindahl, U. (1976) *FEBS Lett.* 69, 51–54.
- Rosenberg, R. D., Armand, G. & Lam, L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3065–3069.
- Lindahl, U., Cifonelli, J. A., Lindahl, B. & Rodén, L. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2817–2820.
- Laurent, T. C., Tengblad, A., Thunberg, L., Höök, M. & Lindahl, U. (1978) *Biochem. J.* 175, 691–701.
- Cifonelli, J. A. & King, J. (1972) *Carbohydr. Res.* 21, 173–186.
- Jacobsson, I., Höök, M., Pettersson, I., Lindahl, U., Larm, O., Wirén, F. & von Figura, K. (1979) *Biochem. J.* 179, 77–87.
- Rome, L. H., Garvin, A. J. & Neufeld, E. F. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 189, 344–353.
- Jacobsson, I., Bäckström, C., Höök, M., Lindahl, U., Feingold, D. S., Malmström, A. & Rodén, L. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 2975–2982.
- Fransson, L.-Å. & Lewis, W. (1979) *FEBS Lett.* 97, 119–124.
- British Pharmacopoeia (1968) (Pharmaceutical Press, London), p. 1345.
- Fransson, L.-Å. (1978) *Carbohydr. Res.* 62, 235–244.
- Shively, J. E. & Conrad, H. E. (1976) *Biochemistry* 15, 3932–3942.
- Shively, J. E. & Conrad, H. E. (1976) *Biochemistry* 15, 3943–3950.
- Höök, M., Lindahl, U., Bäckström, C., Malmström, A. & Fransson, L.-Å. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3908–3915.
- Lindahl, U., Höök, M., Bäckström, C., Jacobsson, I., Riesenfeld, J., Malmström, A., Rodén, L. & Feingold, D. S. (1977) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 36, 19–24.

FRA 85-1184

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE 26 bis, rue de Léningrad, 75800 Paris Cédex 08

SI SOUSSIGNÉ(S) REQUIERT(S) RÉGULIÈREMENT PAR LA PRÉSENTE LA DELIVRANCE DU TITRE  
BREVET INDUSTRIEL CI-DESSOUS:  
à titre unique dans le cas d'achat

- ☐ BREVET D'INVENTION ☒ CERTIFICAT D'ADDITION  
☐ CERTIFICAT D'UTILITÉ ☐ DEMANDE D'INSONNAIRE  
☐ TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

DATE DE REMISE DES PIÈCES 20 Jui 79	DATE DE DÉPÔT 20/07/79
N° D'INSCRIPTION 79 18873	

RÉFÉRENCE DU DEMANDEUR EG/SB/JTa - 159-79-01  
OU DU MANDATAIRE:

## 1) TITRE DE L'INVENTION

Composition mucopolysaccharidique ayant une activité régulatrice de la coagulation, médicament la contenant et procédé pour l'obtenir.

2) DEMANDEUR: NOM ET PRÉNOMS (COULEUR LE NOM PATRONYMIQUE) OU DÉNOMINATION ET FORME JURIDIQUE:

CHOAY S.A.

N° SIRENE LE CAS ÉCHÉANT

NOMBRE DE  
REVENDICATIONS:

CODE REG. DÉPÔT DE DROIT  
DÉPÔT POSTAL - 99

## REQUÊTE

RATTACHEMENT DE LA DEMANDE D'INSONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION  
NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE:

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE  
DOIT ÊTRE ADRESSÉE:

CABINET PLASSERAUD  
84, rue d'Amsterdam  
75009 P ARIS

LE CAS ÉCHÉANT, DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL ET NUMÉRO  
DE TÉLÉPHONE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE:

## DOCUMENT COMPORTANT DES RECTIFICATIONS

Pages n°

8, 9, 14 (lettre 2.08.79)

Planches n°

BT/445

13-25

## DOCUMENT COMPORTANT DES RECTIFICATIONS

Pages n°

23-25 (lettre 2.08.79)

Planches n°

BT/445

3 NOV 1979

M P



française

48, avenue Théophile Gautier  
75016 PARIS

PAYS France

LE DEMANDEUR EST ☒ LE DÉPÔT

SI LE DEMANDEUR REQUIERT LE BÉNÉFICE DU PAIEMENT ÉCHELONNÉ ET L'ABUSSEMENT DE L'AVIS PRÉLIMINAIRE, SUIVANT

LE DEMANDEUR REQUIERT LE BÉNÉFICE DU PAIEMENT ÉCHELONNÉ DE LA TAXE D'AVANCE DOCUMENTAIRE

LE DEMANDEUR BÉNÉFICIE POUR L'INVENTION CONCERNÉE D'UNE RÉGION DE RÉDUCTION DES TAUX DE TAXE

☒ NON☒ NON☒ NON

ATOME DE PRIORITÉ (en chiffres arabes)	DATE DE DÉPÔT (en chiffres arabes)	NUMÉRO	

SI RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION:

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE brevet d'invention N° 78 31357 DATE DE DÉPÔT 6.11.78  
AUPRÈS DES BUREAUX 1° 1° 2° 3° 4° 5° 6° 7° 8° 9° 10°

CABINET PLASSERAUD

SIGNATURE  
DU DEMANDEUR  
OU  
DU MANDATAIRE

SIGNATURE DU PRÉFÈRE A LA RECEPTION

SIGNATURE APRES ENDOSSEMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

INPI/02/100a - 00/79

INPI/02/100a - 00/79

PREMIER CERTIFICAT D'ADDITION

au BREVET PRINCIPAL n° 78 31357  
du 6 novembre 1978

COMPOSITION MUCOPOLYSACCHARIDIQUE AYANT UNE  
ACTIVITE REGULATRICE DE LA COAGULATION, MEDICAMENT LA  
CONTENANT ET PROCEDE POUR L'OBTENIR



CHOAY S.A.

L'invention est relative à une fraction mucopolysaccharidique douée de propriétés biologiques, lui permettant notamment de jouer un rôle régulateur vis-à-vis de la coagulation sanguine. Une telle fraction peut notamment être obtenue à partir de préparations d'héparine, telles qu'extraites de tissus de mammifères.

L'invention représente un développement de celle qui fait l'objet de la demande de brevet n° 78 31357 déposée le 6 novembre 1978.

On rappellera que l'invention de la demande de brevet principal concerne, dans l'un de ses aspects, une fraction mucopolysaccharidique susceptible d'être obtenue à partir de l'héparine ou de fractions comportant des constituants hépariniques de poids moléculaires s'étageant notamment d'environ 2.000 à 50.000, tels qu'obtenus par extraction à partir de tissus de mammifères. La fraction de la demande de brevet principal est caractérisée en ce qu'elle est soluble dans un milieu hydro-alcoolique (eau-éthanol) ayant un titre de 55-61° GL, en ce qu'elle tend à l'insolubilité dans un milieu eau-éthanol ayant une teneur en alcool plus élevée, en ce qu'elle est insoluble dans l'alcool pur, et en ce qu'elle présente un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont respectivement dans un rapport au moins égal à 2, notamment d'au moins 3, de préférence supérieur à 6.

Ces fractions mucopolysaccharidiques donnent lieu à des fractionnements supplémentaires, permettant l'obtention de fractions mucopolysaccharidiques de haute activité spécifique, au niveau du titre Yin-Wessler et présentant des rapports du titre Yin-Wessler au titre USP dépassant 10, voire 16.

Le titre de Yin-Wessler est mesuré selon la techni-

que de ces auteurs qui est décrite dans "J. Lab. Clin. Med.", 1976, 81, 298-300.

De même, le titre USP, qui mesure, de façon en soi connue, une intensité de coagulation globale dans des conditions bien déterminées, est bien connu. Pour mémoire, il a été mis en oeuvre de la façon décrite dans la Pharmacopée des Etats-Unis XIX, pp. 229-230 (voir aussi le Second Supplement USP-NF, p. 62, et le Quatrième Supplement USP-NF, page 90, respectivement intitulés "Drug Substances and Dosage Forms" (substances médicamenteuses et modes de dosage)).

L'invention de la demande de brevet principal fournit donc un principe actif particulièrement intéressant par la capacité qu'il a d'inhiber le facteur Xa de façon qui peut être très sélective, capacité qui contraste avec son activité sur la coagulation globale, laquelle peut être maintenue à un niveau très faible.

Cette fraction mucopolysaccharidique constitue un principe actif de médicament anticoagulant particulièrement avantageux, dans la mesure où l'on peut à ce jour admettre que l'inhibition préférentielle d'un facteur activé, intervenant à un stade plus proche de la thrombinoformation, pratiquement en aval et à l'intersection des voies intrinsèque et extrinsèque, est susceptible d'assurer une protection contre les risques d'hypercoagulabilité, équivalente à celle procurée par l'héparine couramment utilisée en thérapeutique, sans cependant, en raison de cette sélectivité d'action, entraîner les mêmes risques hémorragiques que ceux de l'héparine classique. Celle-ci est en effet apte à inhiber non seulement le facteur Xa, mais également d'autres facteurs intervenant tant en amont qu'en aval de celui-ci, à d'autres stades des voies de coagulation, par exemple le facteur IIa. On conçoit que le rééquilibrage *in vivo* du système de coagulation et de fibrinolyse, lorsque celui-ci tend à se déséquilibrer sous l'effet d'une cause pathologique ou d'une intervention extérieure, par exemple chirurgicale, soit plus facile à réaliser avec un médicament agissant sélectivement sur un facteur spécifique, le facteur X, plus particulièrement au niveau de l'inhibition du facteur Xa, qu'avec un



médicament susceptible d'agir de façon non différenciée sur plusieurs facteurs de coagulation à la fois.

La demande de brevet principal définit également un procédé pour obtenir une telle fraction mucopolysaccharidique, ce procédé étant caractérisé par :

- la mise en suspension dans un milieu hydro-alcoolique du type eau-éthanol, ayant un titre compris entre environ 55 et environ 61° GL, de préférence de l'ordre de 58° GL, d'une matière à base d'héparine ou de constituants hépariniques dont les poids moléculaires s'étagent notamment de 2.000 à 50.000, cette matière ayant une teneur réduite en sels minéraux, de préférence inférieure à 1 % en poids,
- la séparation de la fraction insoluble et la récupération de la solution contenant la fraction mucopolysaccharidique dissoute, dont elle peut à son tour être séparée, notamment par précipitation alcoolique, à partir du susdit milieu hydro-alcoolique.

La matière première, à partir de laquelle le mucopolysaccharide selon l'invention peut être extrait, peut être constituée par une héparine de qualité pharmaceutique classique, injectable, ou par une héparine brute telle qu'elle est obtenue à l'issue des opérations d'extraction de ce principe actif à partir de tissus ou d'organes de mammifères, notamment de mucus d'intestins ou de poumons, par exemple de porc ou de boeuf. Elle peut encore être constituée par les fractions qui sont normalement écartées (produits de rejet) lors de la purification d'une telle héparine brute, en vue de l'obtention d'une héparine de qualité injectable et d'activité spécifique plus élevée, à condition bien entendu que les produits de rejet de moindre activité spécifique contiennent encore des constituants hépariniques.

Il est alors possible, à partir de matières premières de ce type, sensiblement exemptes de protéines, d'acides nucléiques et de sels minéraux, de préférence lorsque des teneurs pondérales de ces derniers sont inférieures à 1 %, d'obtenir par extraction à l'alcool 55-61° GL une fraction mucopolysaccharidique contenant des constituants de faibles poids moléculaires, dont les titres Yin-Wessler et USP sont dans un rapport d'environ 2 à environ 5, notamment de 3 à 5.





La demande de brevet principal a également déjà défini des variantes de procédé supplémentaires permettant un enrichissement supplémentaire des fractions traitées en un "produit de fractionnement", dont les titres Yin-Wessler et USP sont dans un rapport encore plus élevé.

Selon l'une de ces variantes, on procède à des fractionnements supplémentaires de la fraction mucopolysaccharidique obtenue à l'issue du procédé sus-décrit, par diverses techniques, telles que gel-filtration ou encore précipitation sélective dans un milieu hydro-alcoolique de titre déterminé, en présence de proportions également déterminées d'un sel minéral, tel que le chlorure de sodium.

Un fractionnement supplémentaire peut être obtenu par une étape supplémentaire appliquée à ladite fraction des mucopolysaccharidiques, préalablement remise en solution dans l'eau, étape qui consiste à ajouter à cette solution aqueuse de 1 à 2 volumes d'éthanol et de 10 à 100 g/l de chlorure de sodium et à recueillir, d'une part, le précipité formé également actif et, d'autre part, le contenu restant dissous dans le surnageant, notamment par une nouvelle précipitation alcoolique, et qui constitue un produit de fractionnement dont les titres Yin-Wessler et USP respectivement sont dans un rapport encore plus élevé que celui relatif à la fraction initiale, notamment passant d'une valeur de l'ordre de 3 à une valeur de l'ordre de 6 à 8.

Selon une autre de ces variantes du procédé selon l'invention, on a obtenu des fractions mucopolysaccharidiques ayant un rapport de titres Yin-Wessler/USP plus élevé par gel-filtration à partir des fractions de première extraction par gel-filtration à partir des fractions de première extraction par le milieu hydro-alcoolique 55-61°GL, après remise en solution préalable dans un solvant aqueux, telle qu'une solution NaCl 0,5 M ; tris-HCl 0,1 M ; pH 7,5. Une telle solution peut être passée sur un gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, sous la désignation commerciale ULTROGEL AcA 44, dont la zone de fractionnement effectif se situe entre des poids moléculaires effectifs de 4.000 à 60.000 (pour les molécules linéaires).

Des fractions mucopolysaccharidiques selon l'invention de la demande de brevet principal, qui ont un rapport de

titres Yin-Wessler/USP plus élevé, sont donc encore celles qui passent après élution d'un volume de 2,5 litres, volume mort non compris (le volume mort étant le volume de liquide que peut contenir la colonne de gel, notamment dans les espaces interstitiels entre grains de gel), lorsque la gel-filtration est conduite, sous un débit de 200 ml/heure, dans une colonne ayant un diamètre de 100 mm et une hauteur de 1 m et lorsque la concentration en mucopolysaccharide et le volume de la solution placée sur la colonne ont été respectivement de 50 mg/ml et 37,5 ml. Les fractions les plus actives sont alors contenues dans les 1,5 litres qui passent ensuite.

Le contenu des premiers 2,5 litres est en grande partie formé d'héparane-sulfates ou héparitine-sulfates, produits de poids moléculaires élevés et de forte viscosité, qui n'ont pas d'activité anticoagulante.

Le passage d'une colonne à une autre colonne de même longueur mais de section différente suppose la modification du volume de solution (de même concentration) à placer sur l'autre colonne, vis-à-vis du volume placé sur la précédente colonne, dans un rapport égal au carré de celui des sections (ou diamètres) de ces colonnes, pour que les mêmes fractions soient obtenues dans un volume d'élution de l'autre colonne se trouvant lui aussi dans un rapport avec le volume d'élution correspondant de la précédente colonne sensiblement égal au carré du rapport desdites sections.

Enfin, comme on l'a également encore décrit dans la demande de brevet principal, il est possible d'obtenir à partir des fractions ayant des rapports de titres Yin/Wessler/USP de l'ordre de 6 à 8, par des fractionnements supplémentaires, notamment par gel-filtration ou analogue, des fractions mucopolysaccharidiques caractérisées par des rapports de titres Yin-Wessler/USP excédant 10, notamment de l'ordre de 13-16, et ayant des titres Yin-Wessler supérieurs à 130, notamment de 135-160 unités/mg.

Il est entendu que les indications de poids moléculaires qui précèdent (et qui suivent, notamment dans les exemples) découlent des mesures de temps de rétention de solutions ayant une teneur déterminée de matière étudiée, dans des expériences de gel-perméation à travers une colonne de gel,

dans des conditions d'élu-  
tion également déterminées, les lo-  
garithmes de ces indications de poids moléculaire étant dans  
la même relation de proportionnalité vis-à-vis des temps de  
rétention mesurés susdits, que le sont ceux des poids molé-  
culaires de 4.000, 6.500, 16.000 et 31.000 respectivement, de  
polystyrène-sulfonates de sodium étalons, notamment ceux com-  
mercialisés par la société dite CHROMPACK (Orsay-les-Usis,  
France), vis-à-vis de leurs temps de rétention respectifs,  
mesurés dans un système et sous des conditions de gel-  
perméation identiques.

L'invention se propose donc de fournir des fractions  
répondant davantage encore aux buts que la demanderesse  
s'était assignée dans la demande de brevet principal, à sa-  
voir fournir des principes actifs de médicaments (et les mé-  
dicaments eux-mêmes) qui permettent de remédier au moins en  
partie à ces difficultés, notamment qui soient capables de  
permettre un rééquilibrage-éventuel et/ou un contrôle plus  
aisé, au prix d'une moindre surveillance clinique du système  
coagulation-fibrinolyse chez des patients affectés d'une pa-  
thologie de la coagulation ou ayant subi un traitement, tel  
qu'une intervention chirurgicale, qui les expose à des ris-  
ques d'hypercoagulabilité.

L'invention concerne des fractions mucopolysacchari-  
diques (ci-après désignées par la référence MPS) exerçant un  
effet régulateur à l'égard de la coagulation, notamment dans  
le sens d'un retard à la coagulation, par la mise en jeu  
d'actions inhibitrices plus sélectives encore que celles des  
MPS définies dans la demande de brevet principal, s'exerçant  
tout particulièrement à l'égard du facteur X activé.

L'invention est relative à une fraction mucopolysac-  
charidique purifiée susceptible d'être obtenue à partir de  
la fraction mucopolysaccharidique du brevet principal, celle-  
ci étant elle-même susceptible d'être obtenue à partir de  
l'héparine ou de fractions comportant des constituants hépa-  
riniques de poids moléculaires de 2.000 à 50.000, tels  
qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par extraction à  
partir de tissus de mammifères, cette fraction étant carac-  
térisée en ce qu'elle est soluble dans un milieu hydro-  
alcoolique (eau-éthanol) ayant un titre de 55-61°GL, en ce  
qu'elle tend à l'insolubilité dans un milieu eau-éthanol



ayant une teneur en alcool plus élevée, en ce qu'elle est in-  
soluble dans l'alcool pur, et en ce qu'elle présente un  
titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont respectivement  
dans un rapport au moins égal à 2, notamment d'au moins 3,  
de préférence supérieur à 6.

La fraction de MPS de la présente invention peut plus  
particulièrement encore être obtenue à partir de l'une ou  
l'autre des fractions également décrites dans la demande de  
brevet principal et respectivement caractérisées :

- en ce qu'elle est dans une opération de gel-filtration sur colonne  
de gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de  
perles, du type commercialisé sous la désignation  
ULTROGEL ACA 44, cette fraction passe après élution d'un  
volume de 2,5 litres, volume mort non compris, lorsque la  
gel-filtration est conduite, sous un débit de 200 ml/  
heure, dans une colonne ayant un diamètre de 100 mm et  
une hauteur de 1 m et lorsque la concentration en muco-  
polysaccharides et le volume de la solution placée sur la  
colonne ont été respectivement de 50 mg/ml et 37,5 ml,  
l'essentiel de cette fraction étant notamment contenu dans  
les 1,5 litres d'éluat qui passent ensuite ;
- par un temps de rétention de l'ordre de 5,7 à 7,5, notam-  
ment de 6,6 à 7,0 minutes dans une colonne, dans un sys-  
tème de gel-perméation sur colonne garnie de silice à gra-  
nulométrie de 10-100 microns, de 250 mm de hauteur et de  
9 mm de diamètre, lorsque 50 µl d'une solution de 1,3 mg/  
ml de cette fraction dans un tampon  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,02 M, ayant  
été placés sur cette colonne, l'on procède ensuite à  
l'élution de ladite fraction sous un débit de 3 ml/minute.

Il résulte de ce qui précède que la fraction et les  
produits selon la présente invention se trouvent être conte-  
nus dans les différentes fractions qui ont été définies dans  
la demande de brevet principal et que, à ce titre, ils en  
possèdent (conjointement avec les autres constituants  
contenus dans ces fractions) toutes les propriétés.

Les fractions selon la présente invention sont carac-  
térisées plus particulièrement encore, d'une part, par une  
affinité particulière à l'égard de l'antithrombine III se  
manifestant par leur capacité de se fixer sur cette dernière,  
notamment dans un système comprenant la mise en contact de



ces fractions avec une antithrombine III fixée sur un support, tel que l'agarose, au sein d'un tampon NaCl 0,2 M, tris-HCl 0,05 M pH 7,5 et, d'autre part, par des titres Yin-Wessler et USP qui sont dans un rapport (rapport YW/USP) au moins égal à 6, le titre Yin-Wessler lui-même étant au moins égal à 300.

Des fractions et composés préférés selon l'invention sont caractérisés par des rapports YW/USP supérieurs à 18, avec une activité Yin-Wessler supérieure à 900.

De préférence encore les fractions et composés selon l'invention sont caractérisés par des rapports YW/USP supérieurs à 50.

Les composés préférés de l'invention sont caractérisés par des rapports YW/USP supérieurs à 65 avec une activité Yin-Wessler supérieure à 1.300.

L'affinité particulière des fractions selon l'invention est à la base du procédé selon la présente invention pour l'obtention de telles fractions, notamment à partir de celles qui ont été définies dans le brevet principal, procédé qui consiste à réaliser une fixation sélective des fractions ou produits de la présente invention sur l'antithrombine III, notamment par la mise en contact des fractions initiales avec l'antithrombine III fixée sur un support, notamment de l'agarose, au sein d'un tampon tel que NaCl 0,2 M, tris-HCl 0,05 M pH 7,5, puis à éluer la fraction fixée avec un tampon de force ionique plus forte, suffisante pour produire la désorption, notamment un tampon NaCl 2 M, tris-HCl 0,05 M.

Bien entendu, les matières premières à partir desquelles les fractions ou les composés de l'invention sont susceptibles d'être obtenus ne sont pas limitées aux fractions qui ont été définies dans la demande de brevet principal. Ils peuvent être obtenus de toutes autres manières appropriées, notamment à partir des matières premières brutes dont on a plus haut rappelé la nature et à partir desquelles peuvent être obtenues les fractions définies dans la demande de brevet principal.

L'invention concerne plus particulièrement encore des composés sensiblement homogènes qui paraissent constituer le principe actif essentiel des fractions ayant fait l'objet de



la demande de brevet principal et que le procédé selon l'invention qui vient d'être défini permet d'obtenir à un état pratiquement pur.

Ces composés sont caractérisés par les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) réalisés dans les conditions indiquées ci-après et qui font l'objet des figures

Se référant plus particulièrement au spectre de RMN des composés selon l'invention pour le proton (<sup>1</sup>H) réalisé sur des solutions de ces composés dissous dans l'eau déaérée à 35°C avec un rayonnement de 270 mégahertz (MHz), on observe à titre d'élément caractéristique du spectre, des signaux de résonance qui, pour des déplacements chimiques de l'ordre de 4,8 et 5,2 ppm, sont sensiblement plus faibles que le signal de résonance qui est également observé pour un déplacement chimique de l'ordre de 5,4 ppm (référence pour la mesure des déplacements : TSP (sodium 3-triméthylsilyl propionate 2,2, 3,3-d<sub>4</sub>)).

Les signaux observés au niveau des déplacements chimiques de 5,4 ; 5,2 et 4,8 ppm correspondent aux signaux qui, dans le cas d'une héparine classique étudiée en RMN dans les mêmes conditions, sont respectivement caractérisés :

- du proton anomère, en position 1, des motifs glucosamine N-sulfatée de l'héparine (signal G<sub>1</sub>) ;
- du proton anomère en position 1, des motifs acide iduronique 2-O-sulfaté (signal I<sub>1</sub>) et
- du proton en position 5 des motifs acide iduronique 2-O-sulfaté (signal I<sub>5</sub>).

Dans les héparines classiques, les signaux (G<sub>1</sub>, I<sub>1</sub>) et (I<sub>5</sub>) présentent tous trois des intensités du même ordre de grandeur.

Pour la commodité du langage, il sera également fait référence ci-après, même en ce qui concerne les fractions ou composés selon l'invention, aux signaux (G<sub>1</sub>), (I<sub>1</sub>) et (I<sub>5</sub>), pour désigner les signaux observés en rapport avec les déplacements chimiques correspondants (que ce soit pour le proton ou pour <sup>13</sup>C). Cette équivalence au niveau du langage s'étendra également aux spectres RMN réalisés dans des conditions et avec des références différentes.

Se référant plus particulièrement au spectre de RMN

des composés selon l'invention pour le carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ), réalisé sur des solutions de ces composés dissous dans l'eau déaérée avec un rayonnement de 20 MHz, on observe à titre d'éléments caractéristiques du spectre (référence pour la mesure des déplacements TM5 (tétraméthylsilane)) :

- pratiquement l'absence de signal de résonance caractéristique de la présence de groupes OH sur le carbone primaire (en position 6) des motifs glucosamine contenus dans les fractions mucopolysaccharidiques de l'invention,
- des signaux supplémentaires, dans la région des signaux ( $\text{I}_1$ ) et ( $\text{G}_1$ ), dans des régions correspondant à des déplacements chimiques de l'ordre de 100 ppm,
- un signal ( $\text{G}_2$ ) supplémentaire près du signal  $\text{G}_2\text{N}$ -sulfaté dans la région 60 ppm,
- la présence d'un signal de résonance dans la région 75 ppm (auquel normalement ne correspond sensiblement aucun signal de résonance dans des spectres de RMN réalisés dans des conditions semblables avec une héparine classique), (les indications de déplacements chimiques sus-indiqués sont appréciées vis-à-vis du  $\text{CH}_3$  des groupes N-acétyl glucosamine contenus dans les MPS selon l'invention (région de 25 ppm dans les spectres joints)).

Les composés homogènes selon l'invention, à l'état pratiquement purifié, qui présentent toutes les caractéristiques qui ont déjà été définies plus haut, pour ce qui est de leurs activités USP et Yin-Wessler et leurs affinités spécifiques vis-à-vis de l'antithrombine III, sont encore caractérisés en ce qu'ils sont formés par un oligosaccharide homogène présentant encore les caractéristiques supplémentaires suivantes :

- il comprend de 8 à 12, notamment dix motifs mono-saccharidiques;
- toutes les positions primaires des motifs glucosamine de cet oligosaccharide sont sulfatées ;
- cet oligosaccharide comporte une unité N-acétyl-glucosamine pour deux unités acide iduronique 2-O-sulfate et pour deux unités N-sulfate-glucosamine, les autres saccharides étant de nature différente et comportant des substituants distincts.

Les poids moléculaires de certains au moins des oligosaccharides selon l'invention se situent dans un intervalle d'environ 2.000 à environ 3.000, notamment d'environ 2.500

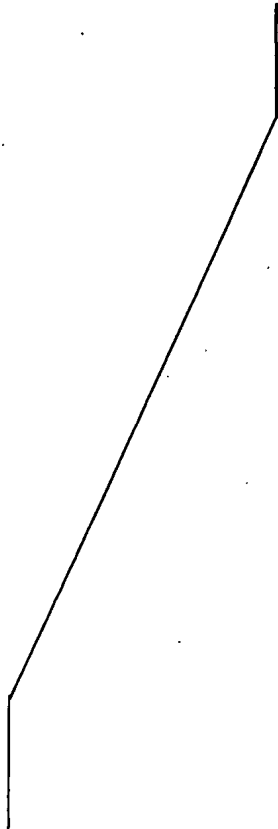


dans la mesure où il s'agit de décasaccharides.

L'invention concerne également des polysaccharides ayant les propriétés générales indiquées ci-dessus, en ce qui concerne plus particulièrement les activités USP et Yin-Wessler, d'une part, et l'affinité pour l'antithrombine III, d'autre part, ces fractions ayant un poids moléculaire plus élevé, mais contenant également dans leur structure une partie oligosaccharide répondant aux conditions évoquées ci-dessus.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description d'exemples de mise en oeuvre de l'invention, notamment avec référence aux dessins dans lesquels :

- la fig. 1 est un diagramme d'élution schématisant d'une fraction conforme à l'invention, à l'occasion de la mise en oeuvre du procédé, également selon l'invention, de séparation sélective de ladite fraction à partir d'une fraction contenant également d'autres constituants ;
- la fig. 2 est représentative d'un diagramme d'élution caractéristique d'une autre fraction mucopolysaccharide préférée, conforme à l'invention ;
- la fig. 3 est le spectre RMN d'une héparine classique pour le proton  $^1\text{H}$  ;
- les fig. 4 et 5 sont des spectres de RMN pour le proton  $^1\text{H}$  de différentes fractions conformes à l'invention ;
- la fig. 6 est un spectre de RMN pour le carbone 13 d'une héparine classique utilisée à titre de comparaison ;
- la fig. 7 est un spectre RMN pour le carbone 13 d'une fraction conforme à l'invention et
- la fig. 8 est un agrandissement d'une partie du spectre de RMN de la fig. 7.



EXEMPLE I :

Matière première :

Elle est constituée par des sous-produits issus de la fabrication d'héparinate de calcium injectable à partir d'héparines brutes, telles qu'elles sont extraites de tissus d'animaux (notamment mucus d'intestins ou poumons de boeuf ou de porc) ou d'héparines purifiées ou semi-purifiées commerciales.

Ces sous-produits contiennent des protéines, des mucopolysaccharides (MPS), notamment héparines, héparanes, héparitines, etc. et, le cas échéant, des acides nucléiques. Ils ont auparavant été dessalés par deux précipitations alcooliques.

La matière première type utilisée dans l'exemple qui suit avait les caractéristiques suivantes :

Poids : 252 kg Titre USP : 82 UI/mg  
Titre Yin-Wessler : 100 UI/mg.

On a alors eu recours aux étapes de traitement décrites ci-après.

Extraction à l'alcool 58° GL :

Les 252 kg de matière première sont dispersés dans 6.000 litres d'alcool 58°GL, sous agitation violente.

On sépare la phase insoluble par décantation et centrifugation.

On récupère la fraction soluble par addition de NaCl et d'alcool 100°GL.

On obtient :

Fraction insoluble : 230 kg recyclés en fabrication,

Fraction soluble : 20,6 kg (titre USP = 21 UI/mg)  
titre Yin-Wessler = 90 UI/mg).

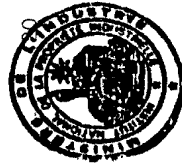
Extraction des bas poids moléculaires de la fraction soluble :

La fraction soluble dans l'alcool 58°GL est dissoute dans 512 litres d'eau (20 volumes).

On ajoute 20g/l de NaCl, soit 10,24 kg, puis 1,5 volumes d'alcool 100°GL, soit 768 litres. La fraction précipitée est recueillie, déshydratée à l'alcool et séchée.

Poids : 19 kg Titre USP = 22 UI/mg  
Titre Yin-Wessler = 89 UI/mg.

Cette fraction est conservée et sera ultérieurement purifiée et transformée en sel de calcium injectable.



Le surnageant de la précipitation à 1,5 volumes est additionné de 1,5 volumes d'alcool, soit 768 litres. La fraction précipitée est recueillie, déshydratée à l'alcool et séchée.

Poids : 700 grammes Titre USP = 6 UI/mg,

Titre Yin-Wessler = 40 UI/mg.

Cette fraction de 700 grammes est un mélange de MPS de bas poids moléculaire, de MPS de haut poids moléculaire peu sulfatés et d'acides nucléiques plus ou moins dégradés.

Elimination des acides nucléiques de la fraction de bas poids moléculaire :

La majeure partie des acides nucléiques est éliminée par précipitation au chlorure de manganèse, de la manière suivante :

La fraction de 700 grammes est dissoute dans 7 litres d'eau. 1 litre de  $MnCl_2$  à 10 % est ajouté sous agitation. Le précipité important formé (constitué des sels de manganèse insolubles des ARN et ADN) est éliminé par centrifugation.

Les MPS sont récupérés du surnageant limpide par précipitation à l'alcool.

Poids : 480 grammes Titre USP = 8 UI/mg,

Titre Yin-Wessler = 54 UI/mg.

Isolement des très bas poids moléculaires par gel-

filtration :

Les très bas poids moléculaires sont séparés par gel-filtration sur ultrogel ACA 44.

Une colonne de 200 mm de diamètre et 1 m de hauteur permet de traiter 25 grammes.

Le diagramme d'élution est du type de celui représenté à la fig. 1.

Trois fractions (numérotées de (1) à (3)) sont recueillies. Elles ont les caractéristiques suivantes : (pour 25 grammes mis en oeuvre au départ) :

(1) poids : 16 grammes Titre USP : 12 UI/mg Titre Y.W : 30 UI/mg,

(2) poids : 7 grammes Titre USP : 6,5 UI/mg Titre Y.W : 70 UI/mg,

(3) poids : 2 grammes Titre USP : 2,1 UI/mg Titre Y.W : 60 UI/mg.

-14-

Chromatographie sur antithrombine III insolubilisée :

La fraction (3) précédente est soumise à une chromatographie sur antithrombine III fixée sur agarose.

Une colonne de 100 ml utilisée actuellement permet de traiter 700 mg de la fraction (3).

L'adsorption se fait en tampon NaCl 0,2 M, tris-HCl 0,05 M pH 7,5.

L'élution est effectuée par du tampon NaCl 2 M, tris-HCl 0,05 M.

La partie non fixée (600 à 650 mg) a un titre USP voisin de 1 à 2 UI/mg et un titre Yin/Wessler de 10 à 20 UI/mg.

La partie fixée (10 à 30 mg) a un titre USP de 10 à 20 UI/mg et un titre Yin-Wessler de 1.000 à 1.400 UI.

EXEMPLE II :

La matière première utilisée provient de sous-fractions telles qu'elles sont obtenues à l'occasion de la purification d'une héparine du commerce, en vue de la production d'une héparine injectable. Elle provient notamment en partie du surnageant obtenu par addition de 0,6 à 0,7 volume d'alcool 100° GL à une solution aqueuse de l'héparine contenant 10 à 20 g par litre de chlorure de sodium, l'héparine purifiée précipitée étant alors récupérée en vue de purifications. La matière première ici retenue contient également divers résidus de purification de l'héparine, notamment ceux obtenus à l'occasion des précipitations alcooliques, en vue de débarrasser l'héparine injectable des traces de sels minéraux.

On ajoute à 10 kg de cette matière première 30 volumes d'alcool 58°GL (300 litres). On soumet la suspension à une dispersion et agitation violentes pendant 15 minutes, l'agitation étant encore maintenue de façon énergique pendant 12 heures. On laisse ensuite reposer pendant 48 heures, afin d'obtenir une décantation de la matière première non solubilisée. Le surnageant légèrement trouble est alors repris et clarifié par centrifugation.

On ajoute au surnageant (volume de 280 litres) 10 litres d'une solution saturée de chlorure de sodium, puis 1 volume (280 litres d'alcool) 100° GL. Le précipité obtenu, qui contient la fraction mucopolysaccharidique, est lavé à



-15-

l'alcool 100°GL, puis séché.

On obtient 660 g d'une fraction dont les titres Yin-Wessler et USP, respectivement, sont déjà dans un rapport supérieur à 2 (fraction P194HH(A)).

On procède encore à un fractionnement supplémentaire de cette fraction, en dissolvant les 660 g dans 13.200 ml d'eau.

On ajoute à la solution formée 264 g de chlorure de sodium, puis 1,5 volumes d'alcool 100°GL (19,8 litres). Le

produit précipité est recueilli, lavé à l'alcool, puis séché. On obtient 640 g de la fraction P194HH(C) ayant les caractéristiques suivantes :

- titre USP : 31 UI/mg,
- titre Yin-Wessler : 100 UI/mg.

Le surnageant contient également des fractions mucopolysaccharidiques actives. Il est alors lui-même additionné de 19,8 litres d'alcool 100° GL et la suspension formée laissée au repos pendant 24 heures.

Le précipité formé est recueilli, lavé à l'alcool 100° GL et séché. On obtient 6 g d'une fraction dite P194HH(P) ayant les caractéristiques suivantes :

- titre USP : 7 UI/mg,
- titre Yin-Wessler : 46 UI/mg.

La fraction P194HH(P) est à nouveau dissoute dans un tampon de tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 30 g/l, à raison de 50 mg/ml.

La solution est soumise à une gel-filtration sur une colonne d'ULTRAGEL AcA 44 (Pharmacia K 100/100, volume : 7 litres ; hauteur 100 cm ; diamètre 10 cm) sous un débit de 200 ml/heure.

Le diagramme d'élution obtenu est schématiquement indiqué à la fig. 1, représentative des variations de la teneur en matière (densité optique DO mesurée à 660 nanomètres) en fonction du volume élué, en litres (1).

On recueille, après passage d'un volume de liquide correspondant au volume mort de la colonne, les fractions successives K, J, I, G, F, E, D, C, B et A, dont les volumes sont indiqués par les longueurs des segments d'abscisse correspondants de la fig. 1.

Chacune de ces fractions possède les caractéristi-

ques analytiques qui figurent dans le tableau ci-après.

TABLEAU I  
Caractéristiques des fractions obtenues

N° fraction	Poids (mg)	Titre USP (UI)	Titre anti-Xa (UI)	Rapport anti-Xa USP
A	120	3,7	44,4	12
B	120	4,5	72	16
C	250	6	54	9
D	150	9	135	15
E	300	9	144	16
F	400	11	143	13
G	300	11,5	161	14
H	200	13	143	11
I	50	13	91	7
J	200	7	14	2
K	3500	0	0	/

On constate que les fractions peuvent être groupées en quatre types :

- Les fractions A, B, C, dont les volumes d'élution correspondent, dans le protocole opératoire sus-décorit, essentiellement au quatrième litre élué, dont les titres USP sont inférieurs à 10 et les titres Yin-Wessler inférieurs à 80 ; leurs poids moléculaires sont au plus de l'ordre de 4.000 ;

b) Les fractions D, E, F, G, H, dont les titres USP sont inférieurs à 10 et les titres Yin-Wessler très élevés : 135 à 161 unités ; ces fractions présentent aussi les rapports de titres Yin-Wessler/USP les plus favorables, de 13 à 16 ; elles sont essentiellement contenues dans le troisième litre d'éluat ; leurs poids moléculaires sont de l'ordre de 4.000 à 10.000, notamment de 4.000 à 8.000 ;

Les fractions A, B et C ci-dessus sont réunies en une fraction unique qui fait alors l'objet d'un fractionnement supplémentaire par fixation sélective sur colonne d'Agarose-Antithrombine III, dans les conditions définies dans l'exemple I. On élue la fraction fixée. On obtient la fraction dénommée ci-après P 194HHPA. Elle possède un titre Yin-Wessler de 310 UI/mg et un titre USP de 40 UI/mg.

On réunit de même les fractions E et F susdites. On procède de même à la séparation des fractions les plus actives par la technique de fixation-élution sus-définie, au moyen de la colonne d'Agarose-Antithrombine III. On obtient finalement une fraction P 194HH ayant un titre Yin et Wessler de 900 UI/mg et un titre USP de 82 UI/mg.

On soumet lesdites fractions P 194HHPA et P 194HH à l'analyse RMN, pour le proton <sup>1</sup>H. On fait de même avec une héparine classique (7021HH).

L'analyse est effectuée sur chacun desdits produits, préalablement dissous dans de l'eau deutériée à raison de 14 à 62 mg/0,35 ml, avec un appareil BRUKER, 270 MHz, équipé d'un système de transformée de FOURIER et permettant l'accumulation de spectres. Les déplacements chimiques ont été mesurés par référence au TSP, comme indiqué plus haut.

La fig. 3 est représentative du spectre de RMN obtenu avec l'héparine classique. Les fig. 4 et 5 sont de même représentatives des spectres de RMN des fractions P 194HHPA et P 194HH/A.

On remarque, par la comparaison des spectres de RMN, que les signaux (I<sub>1</sub>) et (I<sub>5</sub>) des fractions selon l'invention sont nettement moins intenses que le signal (G<sub>1</sub>), alors que ces signaux sont sensiblement de même intensité dans le spectre de l'héparine de référence.

# EXEMPLE III :

En appliquant les techniques décrites dans les exemples I et II à d'autres matières premières, on a obtenu de façon semblable des fractions :

P 219 III :	Titre USP.....= 14 UI/mg
	Titre Yin-Wessler.....= 1350 UI/mg
P 225 III :	Titre USP.....= 17 UI/mg
	Titre Yin-Wessler.....= 1320 UI/mg
P 231 III :	Titre USP.....= 16,2 UI/mg
	Titre Yin-Wessler.....= 1400 UI/mg
P 194 III A :	Titre USP.....= 82 ui/mg
	Titre Yin-Wessler.....= 900 u/mg
P 242 III A :	Titre USP.....= 16 ui/mg
	Titre Yin-Wessler.....= 1800 u/mg
P 255 III A :	Titre USP.....= 36 ui/mg
	Titre Yin-Wessler.....= 2145 u/mg

On a soumis la fraction P 242HHA à l'analyse RMN, pour le carbone 13 (<sup>13</sup>C) (fig. 7 et 8). On a fait de même avec l'héparine classique de référence 7071HH (fig. 6). L'analyse est effectuée sur chacune des fractions (en solution dans l'eau détertiée à raison de 100 mg dans 1 ml de D<sub>2</sub>O avec un appareil VARIAN CFT-20, 20 MHz, équipé d'un système de transformée de FOURIER (référence pour la mesure des déplacements chimiques : TMS).

25 On remarque :

- pratiquement l'absence de signal de résonance caractéristique de la présence de groupes OH sur le carbone primaire (en position 6 des motifs glucosamine contenus dans les fractions mucopolysaccharides de l'invention),
- 30 - des signaux supplémentaires (non contenus dans le spectre RMN de l'héparine de référence dans la région des signaux (I<sub>1</sub>) et (G<sub>1</sub>), dans des régions correspondant à des déplacements chimiques de l'ordre de 100 ppm,



- un signal supplémentaire dans la région 60 ppm près du signal (G<sub>2</sub>),
- la présence d'un signal de résonance dans la région 75 ppm (auquel normalement ne correspond sensiblement aucun signal de résonance dans des spectres de RMN réalisés dans des conditions semblables avec une héparine classique),
- 5 (les indications de déplacements chimiques sus-indiqués sont appréciées vis-à-vis du CH<sub>3</sub> des groupes N-acétyl glucosamine contenus dans les MPS selon l'invention (région de 25 ppm dans les spectres joints N-Ac dans les figures 7 et 8).

Les signaux particuliers aux fractions ou composés selon

10 l'invention sont marqués d'un astérisque dans les fig. 7 et 8.

La fig. 8 comporte également la courbe d'intégration CI, laquelle permet de constater que :

- le composé étudié est homogène, donc pratiquement pur,
- il présente les caractéristiques d'un décasaccharide,
- 15 - il comporte une unité N-acétyl-glucosamine, pour deux unités-acide iduronique 2-O-sulfate et pour deux unités N-sulfate-glucosamine.

Les fractions selon l'invention sont particulièrement actives in vivo.

20 Des lapins ont reçu 500 UI/kg par voie sous-cutanée. Il s'agit d'une dose importante donnée intentionnellement, les lapins ayant beaucoup plus d'antithrombine que les humains. On constate que 500 UI Yin et Wessler provoquent dans la deuxième heure chez le lapin une héparinémie de 0,85 UI/ml exprimée en unités anti-Xa, alors qu'il n'y a que 0,15 ml exprimée en TCK (temps de céphaline-kaolin).

Comparativement : 500 UI/USP de l'héparinate

de calcium normal donnent 0,55 UI/ml exprimée en anti-Xa contre 0,30 UI/ml en TCK.

30 On constate donc que l'action de 500 UI anti-Xa est plus forte que celle de 500 UI USP d'une héparine normale par le dosage de Yin-Wessler. Le résultat est inversé quand on s'exprime en TCK.

35 Les fractions ou composés selon l'invention peuvent être utilisés sous toutes les formes de sels thérapeutiquement utiles, notamment de métaux physiologiquement acceptables (sels de sodium, calcium, magnésium ou sels mixtes). On passe



éventuellement de l'un à l'autre par le procédé décrit dans la demande de brevet n° 73 13580 déposée le 13 avril 1973, au nom de la demanderesse.

Les essais *in vitro* et *in vivo* sont donc tous deux dans le sens d'une action de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention nettement plus sélective, notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa, que celle de l'héparine de référence.

Les fractions mucopolysaccharidiques selon l'invention sont atoxiques. L'administration de 100 mg/kg n'entraîne chez le lapin aucune réaction toxique et aucun effet pyrogène dans le test de pyrogénicité sur le lapin conforme à la Pharmacopée française.

L'invention concerne donc plus particulièrement des fractions mucopolysaccharidiques du type qui vient d'être décrit, ayant notamment une activité d'au moins 300, de préférence au moins 900, et même de façon plus avantageuse encore d'au moins 1.000 UI/mg (titre Yin-Wessler). Elle concerne également les préparations pharmaceutiques, ayant des activités semblables, exemptes de substances pyrogènes, et en association avec des excipients pharmaceutiques. Elle concerne en particulier des solutions concentrées de ces fractions, injectables, stériles, utilisables en thérapeutique pour le contrôle de la coagulation sanguine, de façon particulièrement avantageuse pour la prévention des thromboses ou embolies post-opératoires, ces solutions contenant de 1.000 à 100.000 UI (Yin-Wessler)/ml de la fraction mucopolysaccharidique, de préférence de 5.000 à 50.000, par exemple de 25.000 UI/ml, lorsque ces solutions sont destinées à l'injection sous-cutanée ou contenant encore par exemple de 500 à 10.000, par exemple 5.000 unités UI/ml de la fraction mucopolysaccharidique, lorsqu'elles sont destinées à l'injection intraveineuse ou à la perfusion.

La fraction mucopolysaccharidique selon l'invention est avantageusement sous forme de sel d'au moins un métal physiologiquement acceptable, tel que le sodium et/ou le calcium. Avantageusement, ces proportions pharmaceutiques sont présentées sous forme de seringues à n'utiliser qu'une fois, prêtes à l'emploi au moment approprié.



Les compositions selon l'invention sont particulièrement adaptées au contrôle (préventif ou curatif) de la coagulation sanguine chez l'homme ou l'animal, notamment dans ceux des cas où l'hôte est soumis à des risques d'hypercoagulabilité, plus particulièrement ceux résultant d'une perturbation de la phase extrinsèque susdite, par exemple comme conséquence d'une libération par l'organisme de thromboplastine, par exemple de thromboplastine tissulaire (interventions chirurgicales, processus athéromateux, développement de tumeurs, perturbations des mécanismes de la coagulation par des activateurs bactériens ou enzymatiques, etc.). Dans le seul but d'illustrer l'invention, et sans que l'on puisse y trouver de cause à limiter la protection de l'invention, on indiquera ci-après, à titre d'exemple, une posologie susceptible d'être utilisée chez l'homme : elle comprend par exemple l'administration au patient de 1.000 à 25.000 UI par voie sous-cutanée, deux à trois fois par jour, selon le niveau des risques d'hypercoagulation ou l'état thrombotique du patient, ou de 1.000 à 25.000 UI par 24 heures par voie intraveineuse, en administration discontinuée à intervalles réguliers ou de façon continue par perfusion, ou encore de 1.000 à 25.000 UI (trois fois par semaine) par voie intramusculaire (titres exprimés en UI Yin-Wessler). Les doses devront naturellement, chez chaque patient, être ajustées selon les résultats des analyses sanguines préalablement effectuées, de la nature de l'affection dont le patient souffre et, d'une façon générale, de son état de santé, comme cela est bien connu.

L'invention concerne également encore l'application des mucopolysaccharides selon l'invention à la constitution de réactifs biologiques utilisables au laboratoire, notamment à titre de référence de comparaison pour l'étude d'autres produits dont est testée l'activité anticoagulante, notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa.

Les mesures qui ont été faites par gel-perméation et auxquelles référence a été faite à la page 7 de la présente description ont été faites, à l'aide d'un chromatographe SPECTRAPHYSICS 3500, sur des colonnes 250 x 9 mm garnies de silice de granulométrie 10-100 microns, notamment celles



-23-

REVENDEICATION

Fraction ou composé ayant des propriétés anticoagulantes, caractérisé par des activités Yin-Wessler et USP dans un rapport supérieur à 18, l'activité Yin-Wessler étant elle-même supérieure à 900.

ORIGINAL

CABINET CHAUS  
Fig. 1/1000000

*M. Wessler*



-22-

commercialisées sous la désignation LICHROPHOSPER, de solutions de ces fractions dans un tampon  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,02 M, à raison de 1,3 mg de matière mucopolysaccharidique/ml (volume initialement déposé sur la colonne : 50  $\mu\text{l}$ ) et sous un débit 5 d'élution de 3 ml/min. La détection des matières a été faite par spectrophotométrie UV (200 m $\mu$ ).

(I<sub>1</sub>) et (G<sub>1</sub>), dans des régions correspondant à des déplacements chimiques de l'ordre de 100 ppm,  
 - un signal (G<sub>2</sub>) supplémentaire près du signal G<sub>2</sub> N-sulfaté dans la région 60 ppm,

5 - la présence d'un signal de résonance dans la région 75 ppm.

7.- Fraction ou composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par un spectre de RMN conforme à celui de l'une au moins des figures 4, 5, 7 et 8.

8.- Fraction ou composé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est formé par un oligosaccharide homogène présentant encore les caractéristiques supplémentaires suivantes :

- il comprend de 8 à 12, notamment dix motifs mono-saccharidiques ;

15 - toutes les positions primaires des motifs glucosamine de cet oligosaccharide sont sulfatées ;

- cet oligosaccharide comporte une unité N-acétyl-glucosamine pour deux unités acide iduronique 2-O-sulfate et pour deux unités N-sulfate-glucosamine, les autres saccharides étant de nature différente et comportant des substituants distincts.

9.- Fraction ou composé selon la revendication 8, caractérisé par un poids moléculaire d'environ 2.000 à environ 5.000, notamment d'environ 2.500.

10.- Procédé pour l'obtention d'une fraction ou d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, appliqué à une matière première étant formée d'une fraction, elle-même caractérisée :

- en ce que, dans une opération de gel-filtration sur colonne de gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, du type commercialisé sous la désignation ULTROGEL Aca 44, cette fraction passe après élution d'un volume de 2,5 litres, volume mort non compris, lorsque la gel-filtration est conduite, sous un débit de 200 ml/heure, dans une colonne ayant un diamètre de 100 mm et une hauteur de 1 m et lorsque la concentration en mucopolysaccharides et le volume de la solution placée sur la colonne ont été respectivement de 50 mg/ml et 37,5 ml, l'essentiel de cette fraction étant notamment contenu dans les 1,5 litres d'éluat qui passent ensuite ;

- par un temps de rétention de l'ordre de 5,7 à 7,5, notamment de 6,6 à 7,0 minutes dans une colonne, dans un système de gel-perméation sur colonne garnie de silice à granulométrie de 10-100 microns, de 250 mm de hauteur et de 9 mm de diamètre, lorsque 50 µl d'une solution de 1,3 mg/ml de cette fraction dans un tampon Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 M, ayant été placés sur cette colonne, l'on procède ensuite à l'élution de ladite fraction sous un débit de 3 ml/minute,

ce procédé consistant à réaliser une fixation sélective de la fraction ou composé de la présente invention sur l'antithrombine III, notamment par la mise en contact des fractions initiales avec l'antithrombine III fixée sur un support, notamment de l'agarose, au sein d'un tampon tel que NaCl 0,2 M, tris-HCl 0,05 M pH 7,5, puis à éluer la fraction ou composé fixé avec un tampon de force ionique plus forte, suffisante pour produire sa désorption, notamment un tampon NaCl 2 M, tris-HCl 0,05 M.

11.- Médicament contenant le composé ou fraction selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou celui obtenu par la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 10 en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.



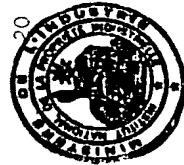
ces fractions avec une antithrombine III fixée sur un support, tel que l'agarose, au sein d'un tampon NaCl 0,2 M, tris-HCl 0,05 M pH 7,5 et, d'autre part, par des titres Yin-Wessler et USP qui sont dans un rapport (rapport YW/USP) au moins égal à 6, le titre Yin-Wessler lui-même étant au moins égal à 300 UI/mg.

Des fractions et composés préférés selon l'invention sont caractérisés par des rapports YW/USP supérieurs à 18, avec une activité Yin-Wessler supérieure à 900.

De préférence encore les fractions et composés selon l'invention sont caractérisés par des rapports YW/USP supérieurs à 50.

Les composés préférés de l'invention sont caractérisés par des rapports YW/USP supérieurs à 65 avec une activité Yin-Wessler supérieure à 1.300 UI/mg.

L'affinité particulière des fractions selon l'invention est à la base du procédé selon la présente invention pour l'obtention de telles fractions, notamment à partir de celles qui ont été définies dans le brevet principal, procédé qui consiste à réaliser une fixation sélective des fractions ou produits de la présente invention sur l'antithrombine III, notamment par la mise en contact des fractions initiales avec l'antithrombine III fixée sur un support, notamment de l'agarose, au sein d'un tampon tel que NaCl 0,2 M,



tris-HCl 0,05 M pH 7,5, puis à éluer la fraction fixée avec un tampon de force ionique plus forte, suffisante pour produire la désorption, notamment un tampon NaCl 2 M, tris-HCl 0,05 M.

Bien entendu, les matières premières à partir desquelles les fractions ou les composés de l'invention sont susceptibles d'être obtenus ne sont pas limitées aux fractions qui ont été définies dans la demande de brevet principal. Ils peuvent être obtenus de toutes autres manières appropriées, notamment à partir des matières premières brutes dont on a plus haut rappelé la nature et à partir desquelles peuvent être obtenues les fractions définies dans la demande de brevet principal.

L'invention concerne plus particulièrement encore des composés sensiblement homogènes qui paraissent constituer le principe actif essentiel des fractions ayant fait l'objet de

la demande de brevet principal et que le procédé selon l'invention qui vient d'être défini permet d'obtenir à un état pratiquement pur.

Ces composés sont caractérisés par les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) réalisés dans les conditions indiquées ci-après et qui font l'objet des figures 4, 5, 7 et 8.

Se référant plus particulièrement au spectre de RMN des composés selon l'invention pour le proton (H) réalisé sur des solutions de ces composés dissous dans l'eau déaérée à 35°C avec un rayonnement de 270 mégahertz (MHz), on observe à titre d'élément caractéristique du spectre, des signaux de résonance qui, pour des déplacements chimiques de l'ordre de 4,8 et 5,2 ppm, sont sensiblement plus faibles que le signal de résonance qui est également observé pour un déplacement chimique de l'ordre de 5,4 ppm (référence pour la mesure des déplacements : TSP (sodium 3-triméthylsilyl propionate 2,2, 3,3-d<sub>4</sub>)).

Les signaux observés au niveau des déplacements chimiques de 5,4; 5,2 et 4,8 ppm correspondent aux signaux qui, dans le cas d'une héparine classique étudiée en RMN dans les mêmes conditions, sont respectivement caractéristiques :  
- du proton anomère, en position 1, des motifs glucosamine N-sulfatée de l'héparine (signal G<sub>1</sub>) ;

- du proton anomère en position 1, des motifs acide iduronique 2-O-sulfaté (signal I<sub>5</sub>).  
- du proton en position 5 des motifs acide iduronique 2-O-sulfaté (signal I<sub>5</sub>).

Dans les héparines classiques, les signaux (G<sub>1</sub>), (I<sub>1</sub>) et (I<sub>5</sub>) présentent tous trois des intensités du même ordre de grandeur.

Pour la commodité du langage, il sera également fait référence ci-après, même en ce qui concerne les fractions ou composés selon l'invention, aux signaux (G<sub>1</sub>), (I<sub>1</sub>) et (I<sub>5</sub>), pour désigner les signaux observés en rapport avec les déplacements chimiques correspondants (que ce soit pour le proton ou pour C<sub>1</sub>). Cette équivalence au niveau du langage s'étendra également aux spectres RMN réalisés dans des conditions et avec des références différentes.

Se référant plus particulièrement au spectre de RMN

# Chromatographie sur antithrombine III insolubilisée :

La fraction (3) précédente est soumise à une chromatographie sur antithrombine III fixée sur agarose.

Une colonne de 100 ml utilisée actuellement permet de traiter 700 mg de la fraction (3).

L'adsorption se fait en tampon NaCl 0,2 M, tris-HCl 0,05 M pH 7,5.

L'élution est effectuée par du tampon NaCl 2 M, tris-HCl 0,05 M.

La partie non fixée (600 à 650 mg) a un titre USP voisin de 1 à 2 UI/mg et un titre Yin/Wessler de 10 à 20 UI/mg.

La partie fixée (10 à 30 mg) a un titre USP de 10 à 20 UI/mg et un titre Yin-Wessler de 1.000 à 1.400 UI/mg.

## EXEMPLE II :

La matière première utilisée provient de sous-fractions telles qu'elles sont obtenues à l'occasion de la purification d'une héparine du commerce, en vue de la production d'une héparine injectable. Elle provient notamment en partie du surnageant obtenu par addition de 0,6 à 0,7 volume d'alcool 100° GL à une solution aqueuse de l'héparine contenant 10 à 20 g par litre de chlorure de sodium, l'héparine purifiée précipitée étant alors récupérée en vue de purifications. La matière première ici retenue contient également divers résidus de purification de l'héparine, notamment ceux obtenus à l'occasion des précipitations alcooliques, en vue de débarrasser l'héparine injectable des traces de sels minéraux.

On ajoute à 10 kg de cette matière première 30 volumes d'alcool 58°GL (300 litres). On soumet la suspension à une dispersion et agitation violentes pendant 15 minutes, l'agitation étant encore maintenue de façon énergique pendant 12 heures. On laisse ensuite reposer pendant 48 heures, afin d'obtenir une décantation de la matière première non solubilisée. Le surnageant légèrement trouble est alors repris et clarifié par centrifugation.

On ajoute au surnageant (volume de 280 litres) 10 litres d'une solution saturée de chlorure de sodium, puis 1 volume (280 litres d'alcool) 100° GL. Le précipité obtenu, qui contient la fraction mucopolysaccharidique, est lavé à

# REVENDECATIONS

1.- Fraction mucopolysaccharidique selon la revendication 1 de la demande de brevet principal, caractérisée, d'une part, par une affinité particulière à l'égard de l'antithrombine III se manifestant par sa capacité de se fixer sur cette dernière, notamment dans un système comprenant la mise en contact de cette fraction avec une antithrombine III fixée sur un support, tel que l'agarose, au sein d'un tampon NaCl 0,2 M, tris-HCl 0,05 M pH 7,5 et, d'autre part, par des titres Yin-Wessler et USP qui sont dans un rapport (rapport YW/USP) au moins égal à 6, le titre Yin-Wessler lui-même étant au moins égal à 300 UI/mg.

2.- Fraction selon la revendication 1, caractérisée par un rapport YW/USP supérieur à 18 et une activité Yin-Wessler supérieure à 900 UI/mg.

3.- Fraction selon la revendication 1 ou 2, caractérisée par un rapport YW/USP supérieur à 50.

4.- Fraction selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée par un rapport YW/USP supérieur à 65 avec une activité Yin-Wessler supérieure à 1.300 UI/mg.

5.- Fraction ou composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par un spectre de RMN pour le proton (<sup>1</sup>H), réalisé sur une solution de ce composé dissous dans l'eau déutériée à 35°C avec un rayonnement de 270 mégahertz (MHz), qui comprend, à titre d'éléments caractéristiques du spectre, des signaux de résonance qui, pour des déplacements chimiques de l'ordre de 4,8 et 5,2 ppm, sont sensiblement plus faibles que le signal de résonance qui est également observé pour un déplacement chimique de l'ordre de 5,4 ppm (référence pour la mesure des déplacements : TSP (sodium 3-triméthylsilyl propionate 2,2, 3,3-d<sub>4</sub>)).

6.- Fraction ou composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par un spectre de RMN pour le carbone 13 (<sup>13</sup>C), réalisé sur une solution de ce composé dissous dans l'eau déutériée, avec un rayonnement de 20 MHz, qui comprend, à titre d'éléments caractéristiques du spectre (référence pour la mesure des déplacements : TMS (tétraméthylsilane)) :

- pratiquement l'absence de signal de résonance caractéristique de la présence de groupes OH sur le carbone primaire (en position 6) des motifs glucosamine contenus dans les fractions mucopolysaccharidiques de l'invention,
- des signaux supplémentaires, dans la région des signaux



Fig.1

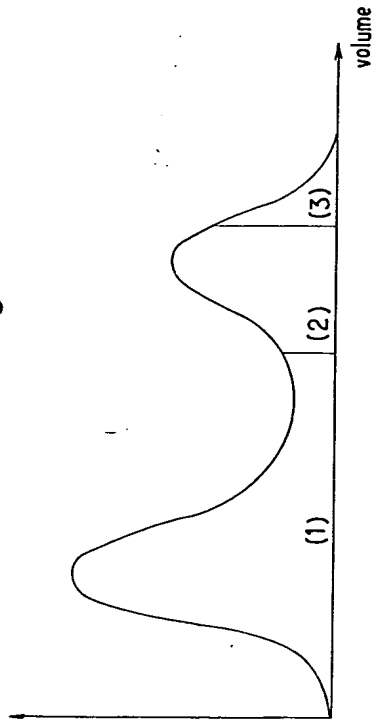
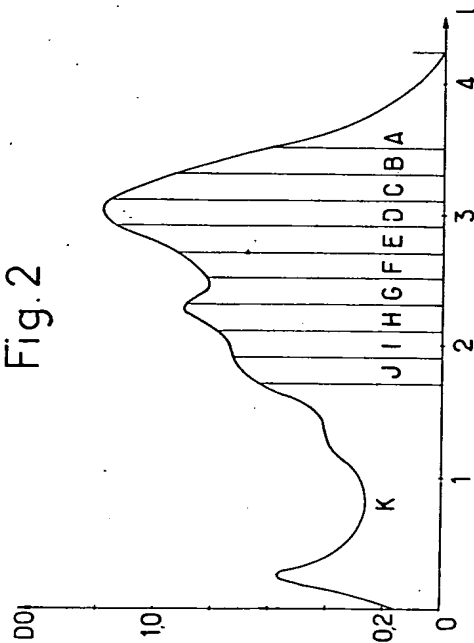


Fig.2



ORIGINAL

*Handwritten signature*

Fig.3

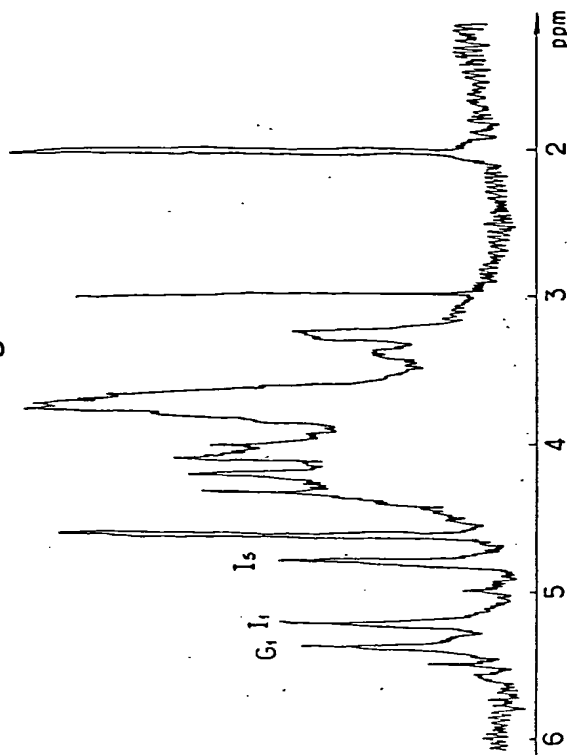
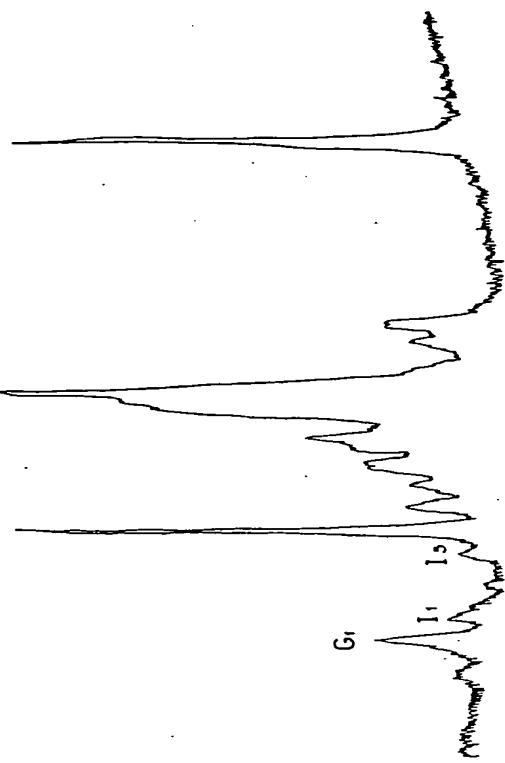


Fig.4



ORIGINAL

CABINET PLASSERAUD  
Per Procuration

Fig.5

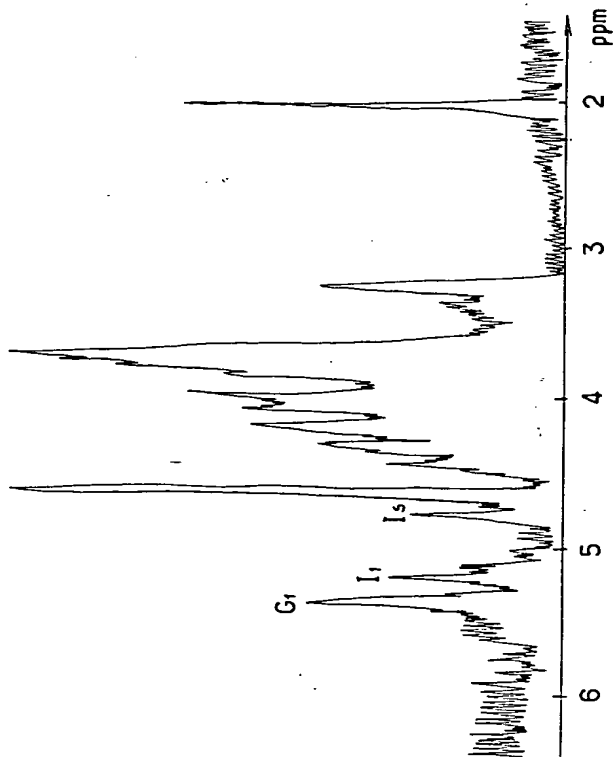
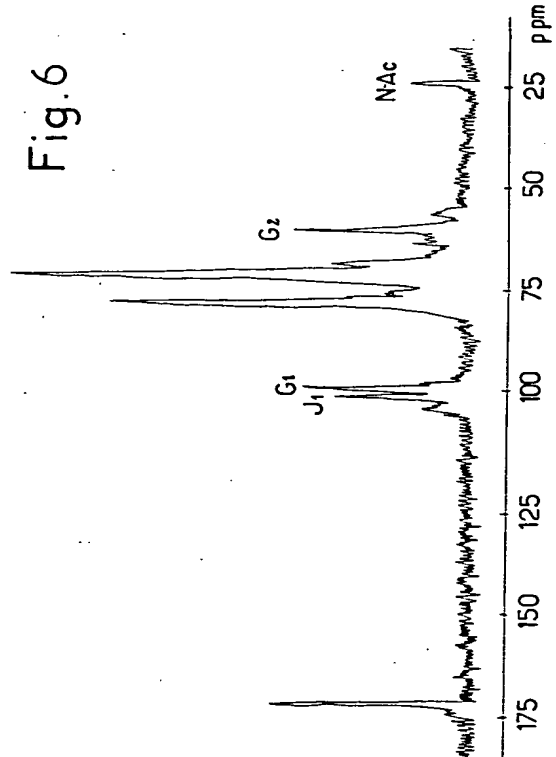


Fig.6



ORIGINAL

*Handwritten signature*

Fig.7

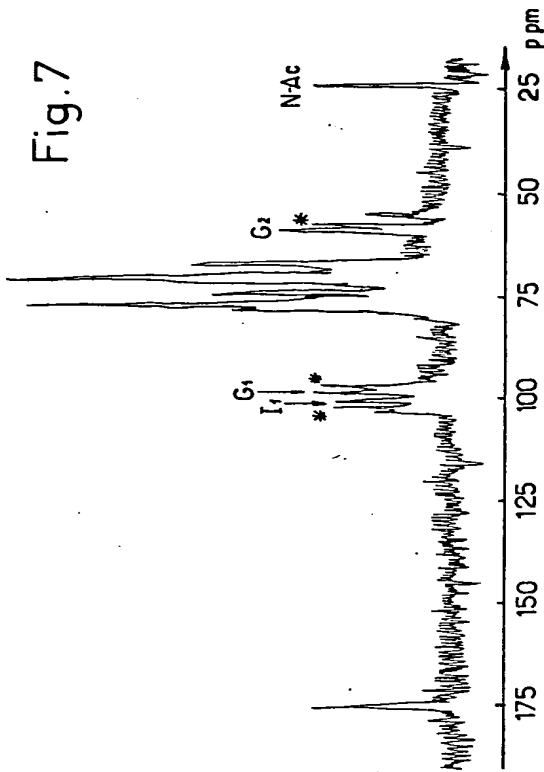
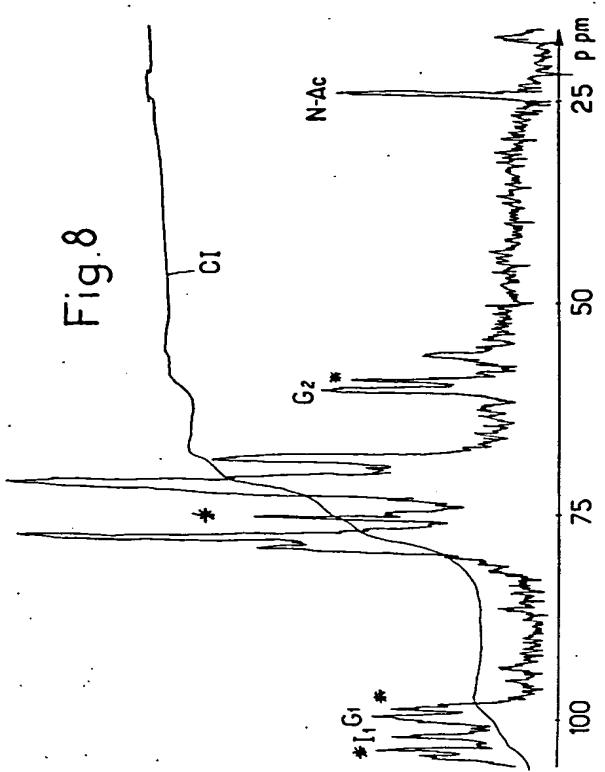


Fig.8



ORIGINAL

PL. IV/4

*Handwritten signature*





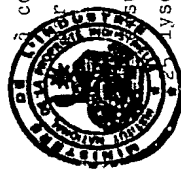
enzyme suivante, le facteur X activé (Xa) intervenant alors, notamment par réaction avec le facteur V et un phospholipide d'origine plaquettaire, dans la production de prothrombinase plasmatique endogène active. Le système extrinsèque ou exogène, qui peut notamment se trouver sous la dépendance directe d'une lésion tissulaire, fait appel à un nombre plus limité de facteurs et comporte notamment la production de thromboplastine tissulaire qui, en combinaison avec le facteur VII, peut, tout comme le facteur VIIIa, transformer le facteur X inactif en facteur Xa. La séquence d'activation de la prothrombine en thrombine est ensuite sensiblement la même que pour le système intrinsèque, mais le phospholipide est ici d'origine tissulaire et non plasmatique.

On peut donc, à la limite, exprimer l'idée que les deux voies, intrinsèque et extrinsèque, se rejoignent au niveau de l'activation du facteur X (aussi appelé facteur Stuart), les deux phases suivantes de la coagulation - thrombinoformation et fibrinoformation - ne donnant alors plus lieu à une distinction entre voies intrinsèque et extrinsèque.

L'aboutissement du processus de coagulation consiste dans la formation d'un caillot de fibrine insoluble, destiné notamment à colmater la lésion à l'origine du déclenchement de ce processus, par exemple au niveau d'un vaisseau sanguin.

Ces processus de coagulation font normalement place ensuite à un processus, dénommé fibrinolyse, destiné à produire la lyse du caillot, notamment sous l'effet de la plasmine, enzyme qui n'existe normalement dans le sang circulant que sous la forme d'un précurseur inactif; le plasminogène, la fibrine elle-même constituant néanmoins l'un des facteurs susceptibles de déclencher la transformation du plasminogène inactif en plasmine fibrinolytiquement active.

En fait, bien que l'on ait, dans ce qui précède, présenté les systèmes de coagulation et de fibrinolyse comme deux processus se produisant successivement dans le temps, il n'en est pas normalement toujours ainsi dans la réalité. En fait, il s'agit de mécanismes équilibrés, selon des processus extrêmement complexes, sous la dépendance de facteurs activateurs et inhibiteurs harmonieusement opposés. Le déséquilibre de ces mécanismes, dans le sens d'une hypercoagulabilité, est alors susceptible d'entraîner des thromboses. A l'opposé, un déséquilibre dans le sens d'une hypocoagulabilité, expose l'hôte à des risques hémorragiques.



C'est évidemment pour pallier les effets d'hypercoagulabilité que l'on a couramment recours aux puissantes propriétés anticoagulantes de l'héparine, en vue de ramener le mécanisme coagulation-fibrinolyse à l'équilibre, chaque fois que celui-ci subit une perturbation importante, par exemple à l'occasion d'une intervention chirurgicale sur l'hôte. Il est cependant bien connu que ces tentatives de rééquilibrage sont extrêmement délicates et que, en conséquence, l'administration de doses trop élevées de médicament anticoagulant - ou l'insuffisante sélectivité de celui-ci - dans le but de prévenir les risques d'hypercoagulation, par exemple l'apparition de thromboses post-chirurgicales, peut finalement être à l'origine d'hémorragies graves : d'où la nécessité d'une surveillance constante des patients traités et des ajustements nécessaires des doses administrées - en continu ou en discontinu - en fonction des résultats de tests, notamment de coagulabilité globale, comme le temps de Howell, qui doivent être pratiqués à intervalles réguliers.

L'invention a donc pour but de fournir des principes actifs de médicaments (et les médicaments eux-mêmes) qui permettent de remédier au moins en partie à ces difficultés, notamment qui soient capables de permettre un rééquilibrage éventuel et/ou un contrôle plus aisé, au prix d'une moindre surveillance clinique du système coagulation-fibrinolyse chez des patients affectés d'une pathologie de la coagulation ou ayant subi un traitement, tel qu'une intervention chirurgicale, qui les expose à des risques d'hypercoagulabilité.

L'invention concerne plus particulièrement une fraction mucopolysaccharidique exerçant un effet régulateur à l'égard de la coagulation, notamment dans le sens d'un retard à la coagulation, cependant par la mise en jeu d'actions inhibitrices plus sélectives que celles de l'héparine, à l'égard d'un nombre plus réduit de facteurs de coagulation, plus particulièrement à l'égard du facteur X activé.

L'invention est donc relative à une fraction mucopolysaccharidique susceptible d'être obtenue à partir de l'héparine ou de fractions comportant des constituants hépariniques de poids moléculaires s'élevant notamment d'environ 2.000 à 50.000, tels qu'obtenus par extraction à partir de tissus de mammifères, cette fraction étant caractérisée en ce qu'elle est soluble dans un milieu hydro-alcoolique (eau-éthanol) ayant un titre de

55-61° GL, en ce qu'elle tend à l'insolubilité dans un milieu eau-éthanol ayant une teneur en alcool plus élevée, en ce qu'elle est insoluble dans l'alcool pur, et en ce qu'elle présente un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont respectivement dans un rapport au moins égal à 2, notamment d'au moins 3, de préférence supérieur à 6.

Ces fractions mucopolysaccharidiques donnent lieu à des fractionnements supplémentaires, permettant l'obtention de fractions mucopolysaccharidiques de haute activité spécifique, au niveau du titre Yin-Wessler et présentant des rapports du titre Yin-Wessler au titre USP dépassant 10, voire 16.

Le titre de Yin-Wessler est mesuré selon la technique de ces auteurs qui est décrite dans "J.Lab. Clin. Med.", 1976, 81, 298-300.

De même, le titre USP, qui mesure, de façon en soi connue, une intensité de coagulation globale dans des conditions bien déterminées, est bien connu. Pour mémoire, il a été mis en oeuvre de la façon décrite dans la Pharmacopée des Etats-Unis XIX, pp. 229-230 (voir aussi le Second Supplément USP-NF, p. 62, et le Quatrième Supplément USP-NF, page 90, respectivement intitulés "Drug Substances and Dosage Forms" (substances médicamenteuses et modes de dosage)).

L'invention fournit un principe actif particulièrement intéressant par la capacité qu'il a d'inhiber le facteur Xa de façon qui peut être très sélective, capacité qui contraste avec son activité sur la coagulation globale, laquelle peut être maintenue à un niveau très faible.

Cette fraction mucopolysaccharidique constitue donc un principe actif de médicament anticoagulant particulièrement avantageux, dans la mesure où l'on peut à ce jour admettre que l'inhibition préférentielle d'un facteur activé, intervenant à un stade plus proche de la thrombinoformation, pratiquement en aval et à l'intersection desdites voies intrinsèque et extrinsèque, est susceptible d'assurer une protection contre les risques d'hypercoagulabilité, équivalente à celle procurée par l'héparine couramment utilisée en thérapeutique, sans cependant, en raison de cette sélectivité d'action, entraîner les mêmes risques hémorragiques que ceux de l'héparine classique. Celle-ci est en effet apte à inhiber non seulement le facteur Xa, mais également d'autres facteurs intervenant tant en amont qu'en aval de celui-ci, à d'autres stades des voies de

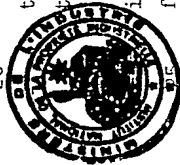
coagulation, par exemple le facteur IIa. On conçoit que le rééquilibrage *in vivo* du système de coagulation et de fibrinolyse, lorsque celui-ci tend à se déséquilibrer sous l'effet d'une cause pathologique ou d'une intervention extérieure, par exemple chirurgicale, soit plus facile à réaliser avec un médicament agissant sélectivement sur un facteur spécifique, le facteur X, plus particulièrement au niveau de l'inhibition du facteur Xa, qu'avec un médicament susceptible d'agir de façon non différenciée sur plusieurs facteurs de coagulation à la fois.

L'invention concerne également un procédé pour obtenir une telle fraction mucopolysaccharidique, ce procédé étant caractérisé par :

- la mise en suspension dans un milieu hydro-alcoolique du type eau-éthanol, ayant un titre compris entre environ 55 et environ 61° GL, de préférence de l'ordre de 58° GL, d'une matière à base d'héparine ou de constituants hépariniques dont les poids moléculaires s'évaluent notamment de 2.000 à 50.000, cette matière ayant une teneur réduite en sels minéraux, de préférence inférieure à 1 % en poids,
- la séparation de la fraction insoluble et la récupération de la solution contenant la fraction mucopolysaccharidique dissoute, dont elle peut à son tour être séparée, notamment par précipitation alcoolique, à partir du susdit milieu hydro-alcoolique.

La matière première, à partir de laquelle le mucopolysaccharide selon l'invention peut être extrait, peut être constituée par une héparine de qualité pharmaceutique classique, injectable, ou par une héparine brute telle qu'elle est obtenue à l'issue des opérations d'extraction de ce principe actif à partir de tissus ou d'organes de mammifères, notamment de mucus d'intestins ou de poumons, par exemple de porc ou de boeuf. Elle peut encore être constituée par les fractions qui sont normalement écartées (produits de rejet) lors de la purification d'une telle héparine brute, en vue de l'obtention d'une héparine de qualité injectable et d'activité spécifique plus élevée, à condition bien entendu que les produits de rejet de moindre activité spécifique contiennent encore des constituants hépariniques.

Il est alors possible, à partir de matières premières de ce type, sensiblement exemptes de protéines, d'acides nucléiques et de sels minéraux, de préférence lorsque des teneurs pon-



dérales de ces derniers sont inférieures à 1 %; d'obtenir par extraction à l'alcool 55-61°GL une fraction mucopolysaccharidique contenant des constituants de faibles poids moléculaires, dont les titres Yin-Wessler et USP sont dans un rapport d'environ 2 à environ 5, notamment de 3 à 5.

On peut remarquer qu'en utilisant des mélanges eau-éthanol ayant plus de 61° GL, le rendement d'extraction devient pratiquement nul. Au contraire, l'utilisation de milieux hydro-alcoolique de titre inférieur à 55° GL entraîne la solubilisation de constituants dont la présence conduit à une réduction du rapport des titres Yin-Wessler/USP.

Il est à remarquer que l'on peut procéder à des fractionnements supplémentaires de la fraction mucopolysaccharidique obtenue à l'issue du procédé sus-décrié, par diverses techniques, telles que gel-filtration ou encore précipitation sélective dans un milieu hydro-alcoolique de titre déterminé, en présence de proportions également déterminées d'un sel minéral, tel que le chlorure de sodium.

Un fractionnement supplémentaire peut être obtenu par une étape supplémentaire appliquée à ladite fraction mucopolysaccharidique, préalablement remise en solution dans l'eau, étape qui consiste à ajouter à cette solution aqueuse de 1 à 2 volumes d'éthanol et de 10 à 100 g/l de chlorure de sodium et à recueillir, d'une part, le précipité formé également actif et, d'autre part, le contenu restant dissous dans le surnageant, notamment par une nouvelle précipitation alcoolique, et qui constitue un produit de fractionnement dont les titres Yin-Wessler et USP respectivement sont dans un rapport encore plus élevé que celui relatif à la fraction initiale, notamment passant d'une valeur de l'ordre de 3 à une valeur de l'ordre de 6 à 8.

Des fractions mucopolysaccharidiques ayant un rapport de titres Yin-Wessler/USP plus élevé peuvent aussi être obtenues par gel-filtration à partir des fractions de première extraction par le milieu hydro-alcoolique 55-61°GL, après remise en solution préalable dans un solvant aqueux, telle qu'une solution NaCl 0,5 M ; tris-HCl 0,1 M ; pH 7,5. Une telle solution peut être passée sur un gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, sous la désignation commerciale ULTRAGEL ACA 44, dont la zone de fractionnement effectif se situe entre des poids moléculaires effectifs de 4.000 à 60.000 (pour les molécules linéaires).



Des fractions mucopolysaccharidiques de l'invention, qui ont un rapport de titres Yin-Wessler/USP plus élevé, sont celles qui passent après élution d'un volume de 2,5 litres, volume mort non compris (le volume mort étant le volume de liquide que peut contenir la colonne de gel, notamment dans les espaces interstitiels entre grains de gel), lorsque la gel-filtration est conduite, sous un débit de 200 ml/heure, dans une colonne ayant un diamètre de 100 mm et une hauteur de 1 m et lorsque la concentration en mucopolysaccharide et le volume de la solution placée sur la colonne ont été respectivement de 50 mg/ml et 37,5 ml. Les fractions les plus actives sont alors contenues dans les 1,5 litres qui passent ensuite.

Le contenu des premiers 2,5 litres est en grande partie formé d'héparane-sulfates ou héparitine-sulfates, produits de poids moléculaires élevés et de forte viscosité, qui n'ont pas d'activité anticoagulante.

Le passage d'une colonne à une autre colonne de même longueur mais de section différente suppose la modification du volume de solution (de même concentration) à placer sur l'autre colonne, vis-à-vis du volume placé sur la précédente colonne, dans un rapport égal au carré de celui des sections (ou diamètres) de ces colonnes, pour que les mêmes fractions soient obtenues dans un volume d'élution de l'autre colonne se trouvant lui aussi dans un rapport avec le volume d'élution correspondant de la précédente colonne sensiblement égal au carré du rapport desdites sections.

Les gel-filtrations de ce type présentent également l'avantage supplémentaire - outre celui qui réside dans l'obtention de fractions dans lesquelles le rapport des titres Yin-Wessler est plus favorable - de fournir des produits dont les solutions ont une viscosité très réduite.

A cet égard, il convient de remarquer aussi, que le procédé selon l'invention d'extraction des fractions mucopolysaccharidiques au moyen d'une solution d'alcool 55-61° GL, de préférence 58°GL, à partir d'une héparine commerciale ou purifiée, notamment de qualité injectable, mais contenant toujours encore des proportions notables d'héparane-sulfates ou des produits analogues à poids moléculaires élevés, constitue en soi aussi un procédé permettant la réduction dans des proportions importantes de la viscosité des solutions aqueuses, qui peuvent ensuite être formées à partir de ces héparines, alors essentiellement exemptes de ces fractions mucopolysaccharidiques.

Cette réduction de viscosité présente un avantage certain, eu égard à l'application ultérieure de telles héparines en thérapeutique anticoagulante, par injection parentérale, notamment sous-cutanée.

A partir des fractions ayant des rapports de titres Yin-Wessler/USP de l'ordre de 6 à 8, il est possible d'obtenir, par des fractionnements supplémentaires, notamment par gel-filtration ou analogue, des fractions mucopolysaccharidiques caractérisées par des rapports de titres Yin-Wessler/USP excédant 10, notamment de l'ordre de 13-16, et ayant des titres Yin-Wessler supérieurs à 130, notamment de 135-160 unités/mg.



Il est entendu que les indications de poids moléculaires qui précèdent (et qui suivent, notamment dans les exemples) découlent des mesures de temps de rétention de solutions ayant une teneur déterminée de matière étudiée, dans des expériences de gel-perméation à travers une colonne de gel, dans des conditions d'élution également déterminées, les logarithmes de ces indications de poids moléculaire étant dans la même relation de proportionnalité vis-à-vis des temps de rétention mesurés susdits, que le sont ceux des poids moléculaires de 4.000, 6.500, 16.000 et 31.000 respectivement, de polystyrène - sulfonates de sodium étalons, notamment ceux commercialisés par la société dite CHROMPACK (Orsay-les-ULis, France), vis-à-vis de leurs temps de rétention respectifs, mesurés dans un système et sous des conditions de gel-perméation identiques.

Dans la mesure où les fractions traitées, quel que soit le degré de purification atteint, se trouvent à l'état de sels d'un métal physiologiquement acceptable, tel que le sodium, elles peuvent ensuite être transformées en des sels mixtes ou simples contenant un autre métal physiologiquement acceptable, tel que le calcium, par tout procédé applicable aux sels

héparine. Avantagusement, on pourra avoir recours au procédé décrit dans le brevet français n° 73 13580 déposé le 13 avril 1973 au nom de la demanderesse. On rappelle que ce procédé consiste essentiellement, partant par exemple d'un sel de sodium d'héparine, à mettre celui-ci en contact avec un sel différent d'un autre métal physiologiquement acceptable, par exemple le chlorure de calcium, au sein d'une solution, à procéder ensuite à la séparation des ions métalliques non liés à l'héparine (par exemple par précipitation alcoolique ou dialyse) et, dans la mesure où le taux de substitution atteint n'est pas suffisant, à remettre en contact, au sein d'une solution, le sel mixte d'héparine obtenu au terme du premier contact, avec une nouvelle dose de l'autre sel, notamment du chlorure de calcium, selon le taux de substitution final désiré.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples préférés de mise en oeuvre de l'invention, notamment en rapport avec les dessins dans lesquels :

- la fig. 1 est représentative d'un diagramme d'élution caractéristique d'une fraction mucopolysaccharidique préférée, conforme à l'invention,
- les fig. 2 à 7 font apparaître des propriétés biologiques comparées de fractions mucopolysaccharidiques conformes à l'invention et d'une héparine classique à activité anticoagulante élevée (en titre USP).

#### EXEMPLE I :

- La matière première est constituée par 100 g d'une héparine injectable ayant un titre de 170 UI/mg (unités USP).
- On ajoute à ces 100 g d'héparine 2.500 ml d'alcool 58°GL. Après une agitation violente pendant 15 minutes, l'agitation forte est maintenue pendant 15 heures. On centrifuge ensuite à 7.000 tours par minute pendant 1 heure et l'on récupère le surnageant : 2.400 ml.
- On ajoute ensuite à ce surnageant 80 ml de solution saturée de chlorure de sodium, puis 2.400 ml d'alcool 100°GL. Le produit précipité est récupéré, lavé à l'alcool et séché. Il pèse 2,1 g. Ses caractéristiques sont les suivantes :
  - titre USP : 45 UI/mg,
  - titre anti-Xa : 160 UI/mg.
- Le rapport anti-Xa/USP est donc de 3,55.

#### EXEMPLE II :

- La matière première utilisée provient de sous-fractions telles qu'elles sont obtenues à l'occasion de la purification d'une héparine du commerce, en vue de la production d'une héparine injectable. Elle provient notamment en partie du surnageant obtenu par addition de 0,6 à 0,7 volume d'alcool 100°GL à une solution aqueuse de l'héparine contenant 10 à 20 g par litre de chlorure de sodium, l'héparine purifiée précipitée étant alors récupérée en vue de purifications. La matière première ici retenue contient également divers résidus de purification de l'héparine, notamment ceux obtenus à l'occasion des précipitations alcooliques, en vue de débar-

rasser l'héparine injectable des traces de sels minéraux.

On ajoute à 10 kg de cette matière première 30 volumes d'alcool 58°GL (300 litres). On soumet la suspension à une dispersion et agitation violentes pendant 15 minutes, l'agitation étant encore maintenue de façon énergique pendant 12 heures. On laisse ensuite reposer pendant 48 heures, afin d'obtenir une décantation de la matière première non solubilisée. Le surnageant légèrement trouble est alors repris et clarifié par centrifugation.

On ajoute au surnageant (volume de 280 litres) 10 litres d'une solution saturée de chlorure de sodium, puis 1 volume (280 litres d'alcool) 100°GL. Le précipité obtenu, qui contient la fraction mucopolysaccharidique, est lavé à l'alcool 100°GL, puis séché.

On obtient 660 g d'une fraction dont les titres Yin-Wessler et USP, respectivement, sont déjà dans un rapport supérieur à 2 (fraction P194HH(A)).

On procède encore à un fractionnement supplémentaire de cette fraction, en dissolvant les 660 g dans 13.200 ml d'eau.

On ajoute à la solution formée 264 g de chlorure de sodium, puis 1,5 volumes d'alcool 100°GL (19,8 litres). Le produit précipité est recueilli, lavé à l'alcool, puis séché. On obtient 6 g de la fraction P194HH(C) ayant les caractéristiques suivantes :  
titre USP : 31 UI/mg,  
titre Yin-Wessler : 100 UI/mg.

Le surnageant contient également des fractions mucopolysaccharidiques actives (leur récupération est décrite à l'exemple IV).

La fraction P194HH(C) contient encore une quantité relativement importante de substances de hauts poids moléculaires en majeure partie d'héparitine-sulfates, sans activité anticoagulante, aussi bien dans le test USP que dans le test de Yin-Wessler.

Après redissolution dans un tampon NaCl 0,5 M, tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, à raison de 50 mg/ml, on procède à une gel-filtration de volume de 150 ml de la solution sur Aca44, en colonne de diamètre 215 mm, de hauteur 1 mètre, sous un débit de 800 ml/heure. Les substances de poids moléculaire élevé, dont la majeure partie des héparitine-sulfates passent avec les 10 premiers litres de solution éluée, volume mort non compris.

Une fraction mucopolysaccharidique à titre Yin-Wessler plus élevée, à rapport de titres Yin-Wessler/USP de l'ordre de 4, à 8, peut être obtenue à partir des 6 litres suivants d'éluat.

### EXEMPLE III :

Cet exemple décrit une variante de traitement de la fraction P194HH(C) de l'exemple II. Redissoute dans du tampon NaCl 0,5 M, tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, à raison de 50 mg/ml, elle est soumise à une gel-filtration sur ULTROGEL Aca 44, en colonne de diamètre 10 cm, hauteur 100 cm. Le débit d'élution est de 200 ml/heure.

L'éluat est recueilli en fraction de 50 ml. La teneur en mucopolysaccharides de chaque fraction est évaluée de la manière suivante : à 1 ml de la fraction sont ajoutés 2 ml d'alcool 100°GL. Après 2 minutes de repos, la turbidité du mélange est mesurée à 660 nanomètres, au spectrophotomètre (mesures de densités optiques). Cette turbidité est directement proportionnelle à la teneur en mucopolysaccharides de la solution testée.

On recueille la fraction C10, contenue dans le dernier tiers du quatrième litre d'éluat, volume mort non compris. Le rapport des titres Yin-Wessler/USP de la fraction C10 est de 50/6.

### EXEMPLE IV :

Le surnageant final de l'exemple II est lui-même additionné de 19,8 litres d'alcool 100°GL et la suspension formée laissée au repos pendant 24 heures.

Le précipité formé est recueilli, lavé à l'alcool 100°GL et séché. On obtient 6 g d'une fraction dite P194HH(P) ayant les caractéristiques suivantes :

- titre USP : 7 UI/mg,
- titre Yin-Wessler : 46 UI/mg.

### EXEMPLE V :

La fraction P194HH(P) est à nouveau dissoute dans un tampon de tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 30 g/l, à raison de 50 mg/ml.

La solution est soumise à une gel-filtration sur une colonne d'ULTROGEL Aca 44 (Pharmacia K 100/100, volume : 7 litres; hauteur 100 cm ; diamètre : 10 cm) sous un débit de 200 ml/heure.

Le diagramme d'élution obtenu est schématiquement indiqué à la fig. 1, représentative des variations de la teneur en matière (densité optique DO mesurée à 660 nanomètres) en fonction

du volume élué, en litres (1).

On recueille, après passage d'un volume de liquide correspondant au volume mort de la colonne, les fractions successives K, J, I, G, F, E, D, C, B et A, dont les volumes sont indiqués par les longueurs des segments d'abscisse correspondants de la fig. 1.

Chacune de ces fractions possède les caractéristiques analytiques qui figurent dans le tableau ci-après.

TABLEAU I  
Caractéristiques des fractions obtenues

N° fraction	Poids (mg)	Titre USP (UI)	Titre anti-Xa (UI)	Rapport $\frac{\text{anti-Xa}}{\text{USP}}$
A	120	3,7	44,4	12
B	120	4,5	72	16
C	250	6	54	9
D	150	9	135	15
E	300	9	144	16
F	400	11	143	13
G	300	11,5	161	14
H	200	13	143	11
I	50	13	91	7
J	200	7	14	2
K	3500	0	0	/

On constate que les fractions peuvent être groupées en quatre types :

- a) Les fractions A, B, C, dont les volumes d'élution correspondent, dans le protocole opératoire sus-décrit, essentiellement au quatrième litre élué, dont les titres USP sont inférieurs à 10 et les titres Yin-Wessler inférieurs à 80 ; leurs poids moléculaires sont au plus de l'ordre de 4.000 ;

- b) Les fractions D, E, F, G, H, dont les titres USP sont inférieurs à 10 et les titres Yin-Wessler très élevés : 135 à 161 unités ; ces fractions présentent aussi les rapports de titres Yin-Wessler/USP les plus favorables, de 13 à 16 ; elles sont essentiellement contenues dans le troisième litre d'éluat ; leurs poids moléculaires sont de l'ordre de 4.000 à 10.000, notamment de 4.000 à 8.000 ;

- c) Les fractions I et J, dont les rapports de titres Yin-Wessler/USP tendent à devenir défavorables, et qui sont probablement déjà contaminées par la fraction K ci-après et d) la fraction K, contenant encore essentiellement des héparane - sulfates dépourvus d'activité anticoagulante...

On a rapporté dans le tableau II les poids moléculaires de certaines des fractions estimées d'après les temps de rétention mesurés en gel-perméation, par référence à ceux des suds polystyrène-sulfonates de poids moléculaires connus. La fraction F se caractérise par un pic principal correspondant à un temps de rétention de 6,6 minutes et par un épaulement correspondant à un temps de rétention de 6,1 minutes, qui témoigne de la présence d'un constituant dont le poids moléculaire se situe vers 7.200 dans le système de référence considéré.

Les mesures ont été faites par gel-perméation (à l'aide d'un chromatographe SPECTRAPHYSICS 3500), sur des colonnes (250 x 9 mm) garnies de silice de granulométrie 10-100 microns, notamment celles commercialisées sous la désignation LICHROPHOS-PHER, de solutions de ces fractions dans un tampon  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,02 M, à raison de 1,3 mg de matière mucopolysaccharidique/ml (volume initialement déposé sur la colonne : 50  $\mu\text{l}$ ) et sous un débit d'élution de 3 ml/minute. La détection des matières a été faite par spectrophotométrie UV (200 m $\mu$ ).

Des fractions mucopolysaccharidiques conformes à l'intention sont donc encore celles qui, dans un système de gel-perméation sur des colonnes garnies de silice à granulométrie de 10-100 microns, de 250 mm de hauteur et de 9 mm de diamètre, sont caractérisées par un temps de rétention de l'ordre de 5,7 à 7,5, notamment de 6,6 à 7,0 minutes dans une telle colonne, lorsque 50  $\mu\text{l}$  d'une solution de 1,3 mg/ml de ces fractions dans un tampon  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,02 M, ayant été placés sur cette colonne, l'on procède ensuite à l'élution desdites fractions sous un débit de 3 ml/minute.

TABLEAU II

PRODUIT	Temps de rétention (minutes)	Poids moléculaires relatifs aux polystyrènes
P194HHP (A)	7,0	2.600
P194HHP (B)	6,9	2.900
P194HHP (C)	6,8	3.300
P194HHP (F)	6,6	4.100
"	6,1*	7.200*
polystyrène-sulfonate (1)	6,6	4.000
" (2)	6,2	6.500
" (3)	5,4	16.000
" (4)	4,7	31.000

\*épaulement

L'invention permet donc d'obtenir des fractions mucopolysaccharidiques à haute activité anti-Xa et présentant à l'égard du facteur Xa une sélectivité remarquable dans le cadre des réactions enzymatiques successives qui caractérisent les processus de coagulation.

Cette activité et cette sélectivité remarquables sont encore illustrées par les résultats des essais pharmacologiques exposés ci-après, lesquels ont été réalisés avec la fraction P188CH, obtenue après transformation de la fraction P194HHC de l'exemple II, encore sous forme de sel de sodium, en la forme de sel de calcium, par le procédé rappelé plus haut.

Ces résultats sont illustrés par les courbes des fig. 2 à 7, lesquelles visent toutes à faire apparaître les effets anticoagulants comparés de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention, d'une part, et d'une héparine classique (170 unités USP/mg), d'autre part.

Les courbes des fig. 2 à 5 correspondent à l'étude de la variation observée *in vitro* des temps de coagulation induits dans des plasmas sanguins humains par des doses croissantes d'une héparine classique, d'une part, et de la fraction P188CH, d'autre part (les essais correspondant aux fig. 4 et 5 ayant été réalisés sur des plasmas exempts de plaquettes et par conséquent appauvris en facteur XI).



Les fig. 6 et 7 concernent des résultats comparés obtenus *in vivo* chez le lapin, avec la même fraction P188CH (fig. 6) et l'héparine de référence (fig. 7) (moyenne des résultats obtenus sur des groupes de 5 lapins). Chacun des lapins avait reçu 500 unités 5 Yin-Wessler par kg de la composition à tester.

Concernant tout d'abord les fig. 2 à 5, elles font apparaître les variations des temps (en secondes) :

- de thrombine (fig. 2),
- de céphaline-kaolin (fig. 3),
- de coagulation en présence de thromboplastine concentrée (fig.4) et de thromboplastine diluée (fig. 5),
- respectivement induites par les préparations étudiées, à savoir la fraction mucopolysaccharidique (courbes a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub> et a<sub>4</sub>) et l'héparine de référence (courbes b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub> et b<sub>4</sub>) en fonction des doses utilisées respectives, toutes exprimées en unités USP/ml.

Les temps de thrombine et les temps de céphaline-kaolin constituent tous deux des types de mesure reflétant plutôt l'action des préparations étudiées sur respectivement l'inhibition du facteur II activé et la coagulation globale. Les courbes des fig. 2 et 3 font à cet égard apparaître clairement que la fraction mucopolysaccharidique selon l'invention exerce un effet nettement plus réduit que celui de l'héparine de comparaison sur l'inhibition de l'activation de la prothrombine et au niveau de la coagulation globale. Par contre, les fig. 4 et 5, qui sont représentatives de phénomènes plus directement liés à la séquence des réactions enzymatiques, caractéristiques de la coagulation extrinsèque (notamment en la relative absence du facteur IIa), font apparaître un net avantage de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention vis-à-vis de l'héparine de référence. La première entraîne en effet dans ces conditions une coagulation plus retardée de l'échantillon sanguin.

Dans la fig. 6, on a représenté les variations des activités mesurées chez le lapin avant reçu 500 unités Yin-Wessler de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention, en fonction du temps, exprimé en heures. Pour l'appréciation de ces activités, on a eu recours à la variation des titres Yin-Wessler (courbe YW<sub>5</sub>) et des titres en temps de céphaline-kaolin (courbe TOK<sub>5</sub>) (UI/ml de plasma).

Les mêmes mesures ont été effectuées avec l'héparine de référence. Les variations correspondantes des activités étudiées sont illustrées par les courbes YW<sub>6</sub> et TOK<sub>6</sub> de la fig. 7. Si l'on examine la fig. 6, on constate que l'administration de 500 unités Yin-Wessler du mucopolysaccharide selon l'invention provoque une activité anti-Xa importante, comparée

à l'effet de coagulabilité globale, exprimée en unités TCK, qui reste relativement faible. On note par exemple qu'à la deuxième heure, l'activité Yin-Wessler est de 0,85 UI/ml, alors que l'activité TCK n'est que de 0,15 UI/ml. Par contre, 500 unités Yin-Wessler/ml de l'héparine de référence induisent une action exprimée par les titres TCK, nettement plus importante relativement à l'activité anti-Xa mesurable par le titre Yin-Wessler. En particulier, on note qu'à la deuxième heure, l'activité anti-Xa correspond à 0,55 UI/ml, et que l'activité anti-coagulante globale, TCK, n'est plus que de 0,38 UI/ml. L'écart entre les deux titres est donc beaucoup moins important que dans le cas du mucopolysaccharide selon l'invention. Le rapport du titre Yin-Wessler au titre TCK passe donc d'une valeur inférieure à 2 pour l'héparine de référence à une valeur supérieure à 5 pour la fraction mucopolysaccharide de l'invention.

Les essais *in vitro* et *in vivo* sont donc tous deux dans le sens d'une action de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention nettement plus sélective, notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa, que celle de l'héparine de référence.

Les fractions mucopolysaccharidiques selon l'invention

sont atoxiques. L'administration de 10.000 UI/kg (titre Yin-Wessler), soit de 100 mg/kg de P188CH, n'entraîne chez le lapin aucune réaction toxique et aucun effet pyrogène dans le test de pyrogénicité sur le lapin conforme à la Pharmacopée française.

L'invention concerne donc plus particulièrement des fractions mucopolysaccharidiques du type qui vient d'être décrit, ayant notamment une activité d'au moins 40, de préférence au moins 50, et même de façon plus avantageuse encore d'au moins 100 UI/mg (titre Yin-Wessler). Elle concerne également les préparations pharmaceutiques, ayant des activités semblables, exemptes de substances pyrogènes, et en association avec des excipients pharmaceutiques. Elle concerne en particulier des solutions concentrées de ces fractions, injectables, stériles, utilisables en thérapeutique pour le contrôle de la coagulation sanguine, solutions contenant de 1.000 à 100.000 UI (Yin-Wessler)/ml de la fraction mucopolysaccharidique, de préférence de 5.000 à 50.000, par exemple de 25.000 UI/ml, lorsque ces solutions sont destinées à l'injection sous-cutanée ou contenant encore par exemple de 500 à 10.000, par exemple 5.000 unités UI/ml de la fraction mucopolysaccharidique, lorsqu'elles sont destinées à l'injection intraveineuse ou à la perfusion.

La fraction mucopolysaccharidique selon l'invention

est avantageusement sous forme de sel d'au moins un métal physiologiquement acceptable, tel que le sodium et/ou le calcium. Avantageusement, ces proportions pharmaceutiques sont présentées sous forme de seringues à n'utiliser qu'une fois, prêtes à l'emploi au moment approprié.

Les compositions selon l'invention sont particulièrement adaptées au contrôle (préventif ou curatif) de la coagulation sanguine chez l'homme ou l'animal, notamment dans ceux des cas où l'hôte est soumis à des risques d'hypercoagulabilité, plus particulièrement ceux résultant d'une perturbation de la phase extrinsèque susdite, par exemple comme conséquence d'une libération par l'organisme de thromboplastine, par exemple de thromboplastine tissulaire (interventions chirurgicales, processus athéromateux, développement de tumeurs, perturbations des mécanismes de la coagulation par des activateurs bactériens ou enzymatiques, etc.). Dans le seul but d'illustrer l'invention, et sans que l'on puisse y trouver de cause à limiter la protection de l'invention, on indiquera ci-après, à titre d'exemple, une posologie susceptible d'être utilisée chez l'homme : elle comprend par exemple l'administration au patient de

1.000 à 25.000 UI par voie sous-cutanée, deux à trois fois par jour, selon le niveau des risques d'hypercoagulation ou l'état thrombotique du patient, ou de 1.000 à 25.000 UI par 24 heures par voie intraveineuse, en administration discontinue à intervalles réguliers ou de façon continue par perfusion, ou encore de 1.000 à 25.000 UI (trois fois par semaine) par voie intramusculaire (titres exprimés en UI Yin-Wessler). Les doses devront naturellement, chez chaque patient, être ajustées selon les résultats des analyses sanguines préalablement effectuées, de la nature de l'affection dont le patient souffre et, d'une façon générale, de son état de santé, comme cela est bien connu.

L'invention concerne également encore l'application des mucopolysaccharides selon l'invention à la constitution de réactifs biologiques utilisables au laboratoire, notamment à titre de référence de comparaison pour l'étude d'autres produits dont est testée l'activité anticoagulante, notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes, en particulier celles dans lesquelles le milieu hydro-alcoolique d'extraction sus-défini est formé par un mélange d'eau



et d'un alcool autre que l'éthanol, par exemple un alcool aliphatique ou aromatique, de préférence un alcool aliphatique saturé, cyclique ou acyclique, tel que des alcools primaires comportant de 1 à 6 atomes de carbone, étant naturellement entendu qu'il convient dans chaque cas de déterminer, par de simples opérations de routine, les proportions eau/alcool du milieu qui conduisent à une extraction d'une fraction mucopolysaccharidique équivalente à celle qui est obtenue avec un mélange eau-éthanol 55-61°GL.

5

# REVENDECATIONS

1 - Fraction mucopolysaccharidique susceptible d'être obtenue à partir de l'héparine ou de fractions comportant des constituants hépariniques de poids moléculaires de 2.000 à 50.000, tels qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par extraction à partir de tissus de mammifères, cette fraction étant caractérisée en ce qu'elle est soluble dans un milieu hydro-alcoolique (eau-éthanol) ayant un titre de 55-61°GL, en ce qu'elle tend à l'insolubilité dans un milieu eau-éthanol ayant une teneur en alcool plus élevée, en ce qu'elle est insoluble dans l'alcool pur, et en ce qu'elle présente un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont respectivement dans un rapport au moins égal à 2, notamment d'au moins 3, de préférence supérieur à 6.

10

2 - Fraction mucopolysaccharidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le rapport de son titre Yin-Wessler à son titre USP est supérieur à 10, voire même à 16.

15

3 - Fraction mucopolysaccharidique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement formée de constituants dont les poids moléculaires sont inférieurs à 10.000.

4 - Fraction mucopolysaccharidique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement formée de constituants dont les poids moléculaires sont compris entre environ 2.000 et environ 8.000.

25

5 - Fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que dans une opération de gel-filtration sur colonne de gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, du type commercialisé sous la désignation ULTROGEL ACA 44, elle passe après élution d'un volume de 2,5 litres, volume mort non compris, lorsque la gel-filtration est conduite, sous un débit de 200 ml/heure, dans une colonne ayant un diamètre de 100 mm et une hauteur de 1 m et lorsque la concentration en mucopolysaccharide et le volume de la solution placée sur la colonne ont été respectivement de 50 mg/ml et 37,5 ml, l'essentiel de cette fraction étant notamment contenu dans les 1,5 litres d'éluat qui passent ensuite.

30

35

6 - Fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est constituée par celle qui, dans un système de gel-perméation sur des colonnes garnies de silice à gra-



• mullométrie de 10-100 microns, de 250 mm de hauteur et de 9 mm de diamètre, est caractérisée par un temps de rétention de l'ordre de 5,7 à 7,5, notamment de 6,6 à 7,0 minutes dans une telle colonne, lorsque 50 µl d'une solution de 1,3 mg/ml de cette fraction dans un tampon  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,02 M, ayant été placés sur cette colonne, l'on procède ensuite à l'éluion de ladite fraction sous un débit de 3 ml/minute.

7 - Fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée par des rapports de titres Yin-Wessler/USP excédant 10, notamment de l'ordre de 13-16, et ayant des titres Yin-Wessler supérieurs à 130, notamment de 135-160 unités/mg.

8 - Fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ses constituants sont à l'état de sels d'eau moins un métal physiologiquement acceptable, tel que le sodium ou le calcium.

9 - Procédé d'obtention d'une fraction mucopolysaccharidique ayant des titres Yin-Wessler et USP dans un rapport supérieur à 2, notamment à 3, caractérisé par :

- la mise en suspension dans un milieu hydro-alcoolique du type eau-éthanol, ayant un titre compris entre environ 55 et environ 61°GL, de préférence de l'ordre de 58° GL, d'une matière à base d'héparine ou de constituants hépariniques dont les poids moléculaires s'étagent notamment de 2.000 à 50.000, cette matière ayant une teneur réduite en sels minéraux, de préférence inférieure à 1 % en poids,

- la séparation de la fraction insoluble et la récupération de la solution contenant la fraction mucopolysaccharidique dissoute, dont elle peut à son tour être séparée, notamment par précipitation alcoolique, à partir du susdit milieu hydro-alcoolique.

10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé par une étape de fractionnement supplémentaire de la fraction mucopolysaccharidique préalablement récupérée à partir du susdit milieu hydro-alcoolique et remise en solution dans l'eau, étape qui consiste à ajouter à cette solution aqueuse de 1 à 2 volumes d'éthanol et de 10 à 100 g/l de chlorure de sodium et à recueillir, d'une part, le précipité formé également actif et, d'autre part, le contenu restant dissous dans le surnageant, notamment par une nouvelle précipitation alcoolique, et qui constitue un produit de fractionnement dont les titres Yin-Wessler et USP respectivement sont dans un rapport encore plus élevé que celui relatif à la fraction initiale, notamment passant d'une valeur de l'ordre de 3 à une valeur de l'ordre de 6 à 8.



11 - Procédé selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que la fraction mucopolysaccharidique obtenue est soumise à une gel-filtration, notamment sur gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, connu sous la désignation commerciale ULTROGEL AcA 4H, dont la zone de fractionnement effectif se situe entre des poids moléculaires effectifs de 4.000 à 60.000 (pour les molécules linéaires).

12 - Fraction mucopolysaccharidique présentant les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de celle obtenue par la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11.

13 - Composition pharmaceutique, notamment pour le contrôle de la coagulation, dont le principe actif est constitué par la fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 12.

14 - Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une solution concentrée de cette fraction, injectable, stérile, utilisable en thérapeutique, pour le contrôle de la coagulation sanguine, solution contenant de 1.000 à 100.000 UI (Yin-Wessler)/ml de la fraction mucopolysaccharidique, de préférence de 5.000 à 50.000, par exemple de 25.000 UI/ml, lorsque ces solutions sont destinées à l'injection sous-cutanée, ou contenant encore par exemple de 500 à 10.000, par exemple 5.000 unités UI/ml de la fraction mucopolysaccharidique, lorsqu'elle est destinée à l'injection intraveineuse ou à la perfusion.

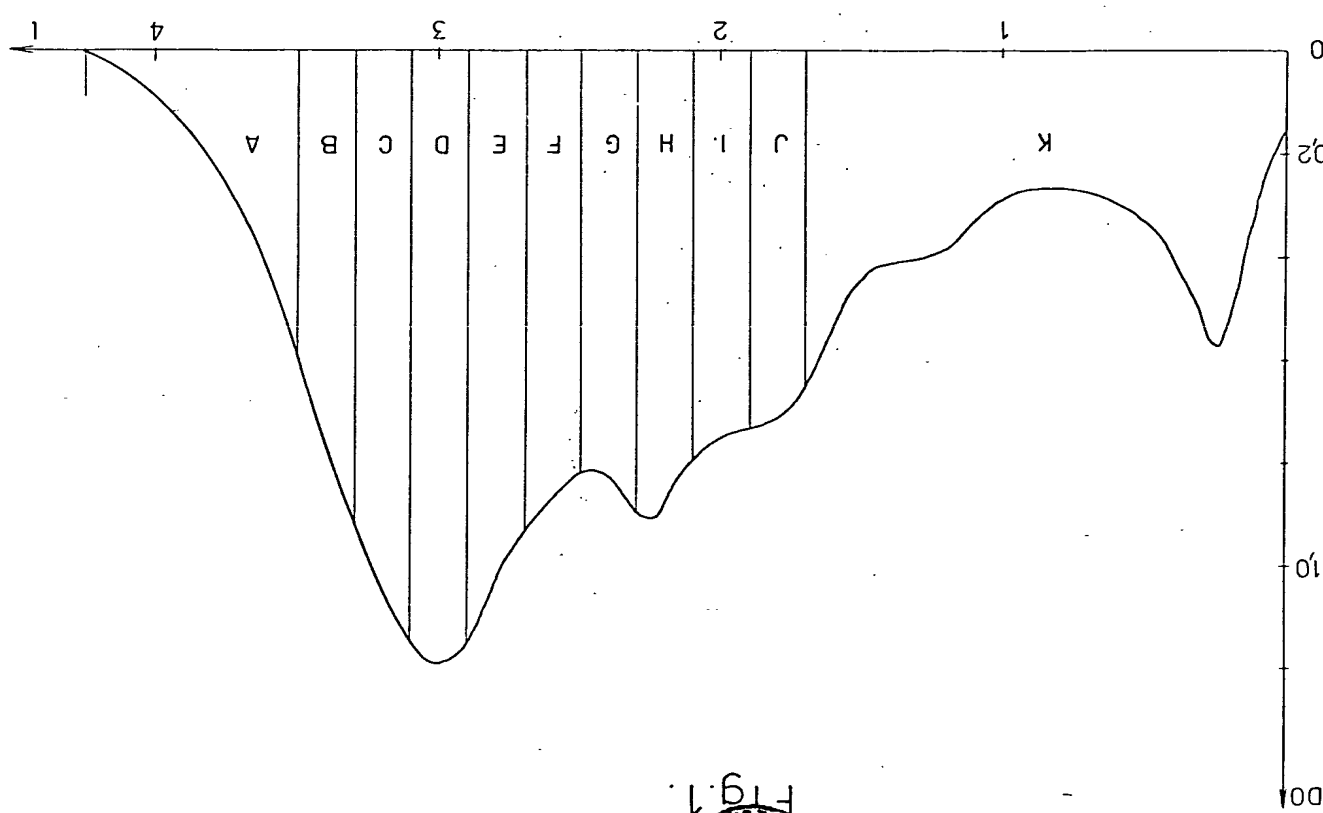


15 - Réactif biologique constitué par la fraction mucopolysaccharidique de l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 12.

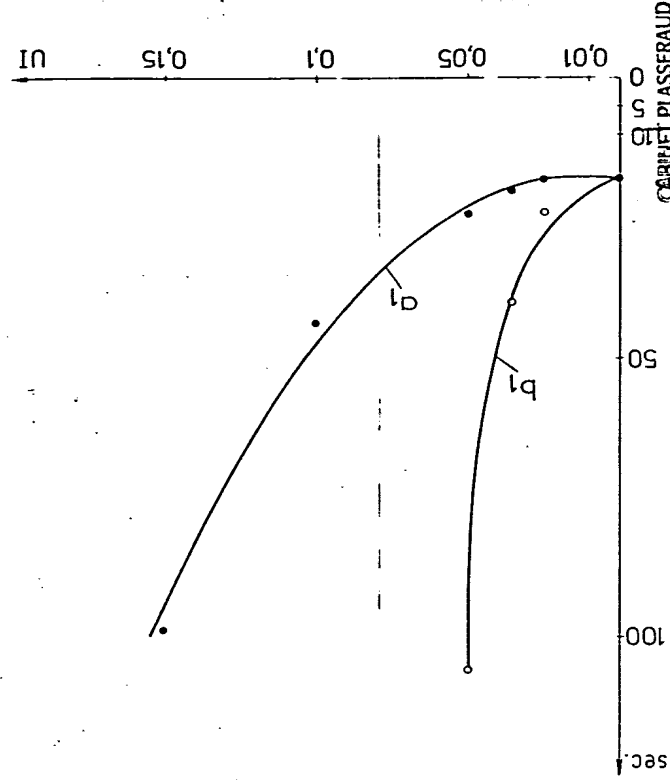
**ORIGINAL**

CABINET PLASSERAUD  
Par Procuration

ORIGINAL



ORIGINAL



F!g.2.

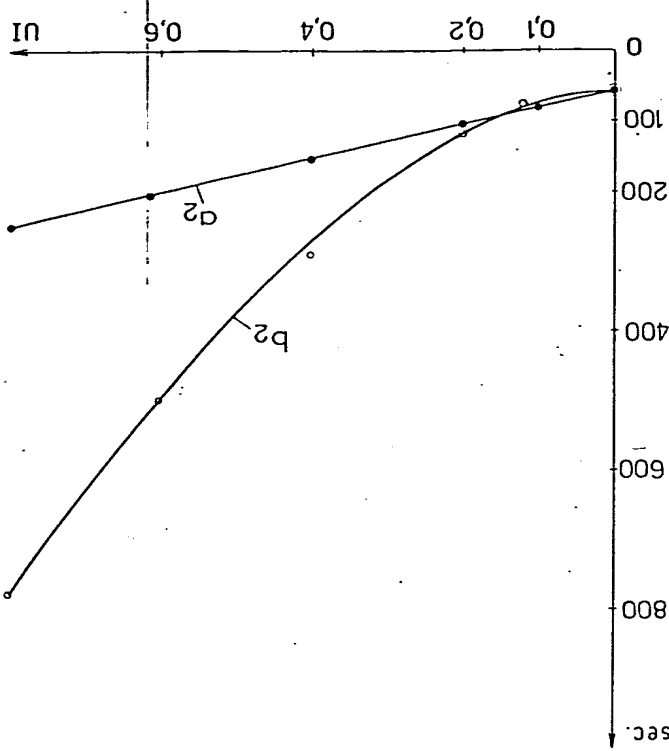


Fig. 3.

Pl.II-4

Pl. I-4

Fig. 6.

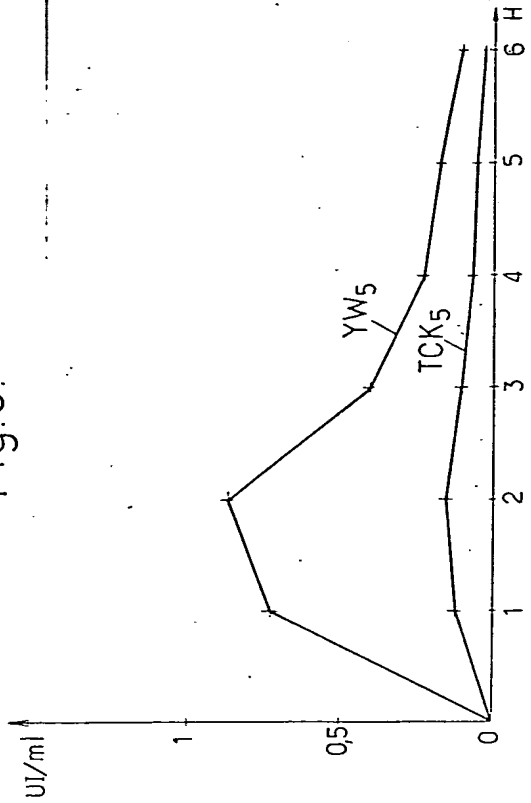
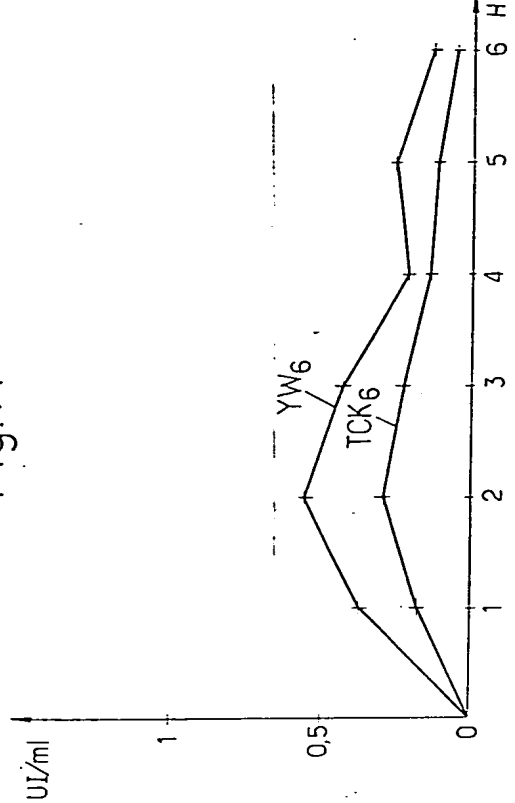


Fig. 7.



CABINET PLASSERAUD  
Pr Proc/fin

ORIGINAL

Fig. 5.

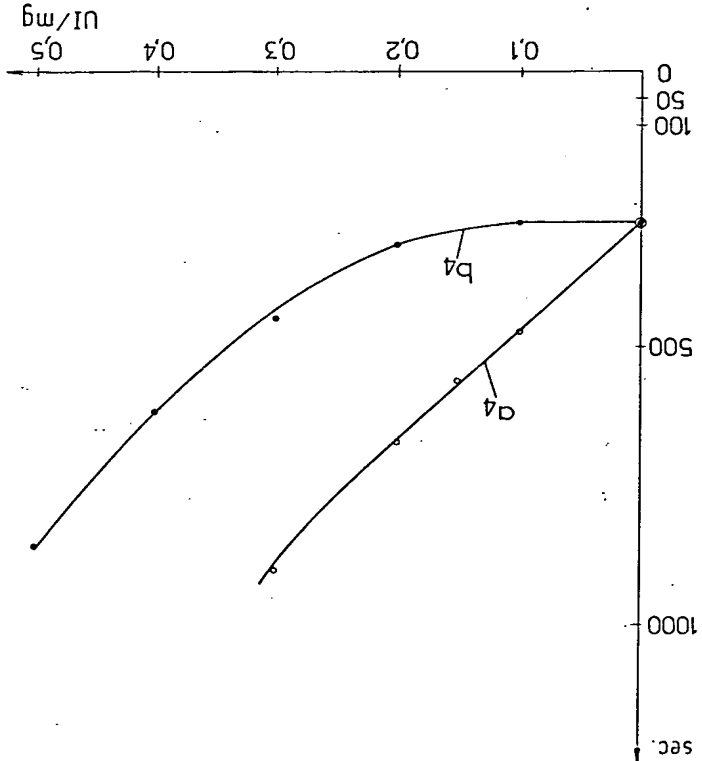
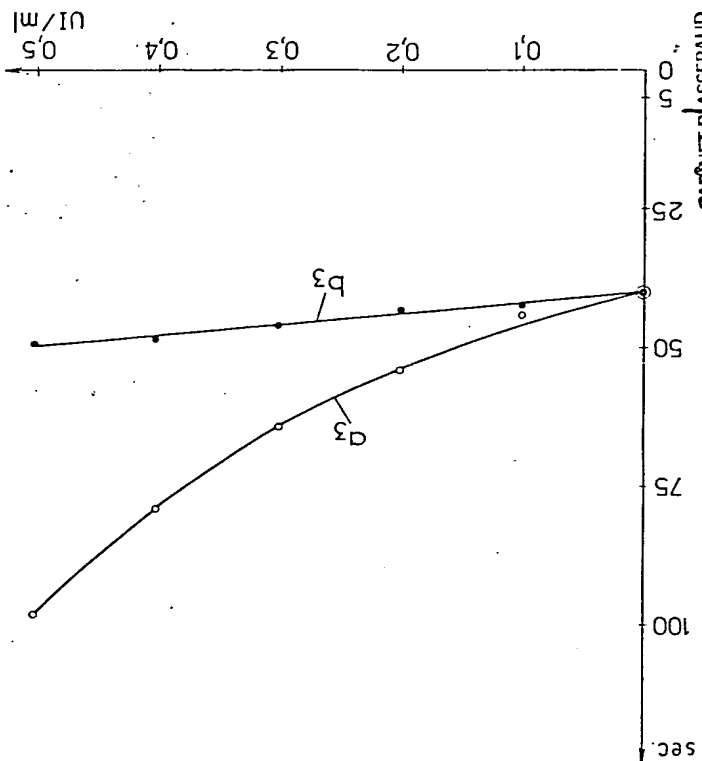


Fig. 4.



CABINET PLASSERAUD  
Pr Proc/fin

ORIGINAL

